



HAL
open science

Composés phénoliques d'algues brunes bretonnes : de la ressources algale à leur extraction éco-responsable et caractérisation chimique jusqu'à leur formulation en cosmétique

Leslie Gager

► To cite this version:

Leslie Gager. Composés phénoliques d'algues brunes bretonnes : de la ressources algale à leur extraction éco-responsable et caractérisation chimique jusqu'à leur formulation en cosmétique. Biologie végétale. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2019. Français. NNT : 2019BRES0016 . tel-03270907

HAL Id: tel-03270907

<https://theses.hal.science/tel-03270907>

Submitted on 25 Jun 2021

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : Biologie Marine

Par

Leslie GAGER

« Composés phénoliques d'algues brunes bretonnes : de la ressource algale à leur extraction éco-responsable et caractérisation chimique jusqu'à leur formulation en cosmétique »

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 28 Octobre 2019
Unité de recherche : Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin

Rapporteurs avant soutenance :

Philippe POTIN Directeur de recherche CNRS,
Farid CHEMAT Professeur, Université d'Avignon

Composition du Jury :

Philippe POTIN Directeur de recherche, CNRS
Farid CHEMAT Professeur, Université d'Avignon
Présidente du jury
Nathalie BOURGOUGNON Professeure, Université de Bretagne Sud
Directrice de thèse
Valérie STIGER-POUVREAU Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale

Invité(s)

Co-encadrante de thèse
Solène CONNAN Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale
Justine DUMAY Maître de conférences, Université de Nantes

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux encadrantes, Dr. Valérie Stiger-Pouvreau et Dr. Solène Connan. Toutes les deux vous m'avez toujours soutenu et vous avez su me guider ! Toujours compréhensives ! J'ai eu beaucoup de chance de vous avoir toutes les deux comme encadrantes ! Je me souviendrais de nos sorties toutes les trois pour aller en réunion, ce sont de très bons moments. Vous m'avez fait grandir et murir pendant ces 3 ans, et je vous en remercie. Votre bienveillance me manquera, c'est sûr !

Je tiens ensuite à remercier Dr. Philippe Potin et Pr. Farid Chemat pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs. Merci également au Dr. Nathalie Bourgougnon pour avoir accepté d'examiner mon travail en tant qu'examinatrice.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Justine Dumay, Grégoire Pithon et Fabienne Guérard. Merci à tous les 3 pour vos précieux conseils et votre bienveillance !

Je tiens ensuite à remercier les différents partenaires du projet RIVAGE 2.0. Tout d'abord, mon premier merci vient à Maud Larnicol, bien entendu, qui m'a fait confiance depuis le début et a cru en moi pour travailler dans ce projet ! Merci pour ta confiance et ces nombreux échanges que nous avons eu qui étaient très intéressants. Dommage de ne pas t'avoir eu à nos côtés jusqu'à la fin du projet. Je remercie Technature d'avoir repris ce projet et notamment Céline C. et Anne M. pour m'avoir ouvert les portes de votre labo.

Je tiens à remercier le partenaire Chimex, et notamment Grégoire Pithon et Louis-Nicolas Gombault. C'était un plaisir de travailler avec vous, d'échanger sur nos différentes connaissances et nos différentes visions, je pense que l'on a bien réussi à mixer nos différentes compétences pour avancer dans ce projet. En espérant vous recroiser dans le futur. Je n'oublie pas Sandrine Decoster qui nous a rejointe par la suite dans le projet RIVAGE.

Merci également au partenaire académique MMS : merci Justine pour tous ces moments passés avec toi, que ce soit pour mon comité, dans le projet pour découvrir le monde obscur des plans d'expérience et aussi pour les moments passés en ta compagnie en Corée du Sud ! Ce sera avec plaisir de retourner courir avec toi !

Merci également au partenaire C-Weed Aquaculture, c'était un plaisir d'échanger avec vous, Jean-François Arbona et Magali Molla, passionnés des algues, vos connaissances sur les algues sont précieuses !

Un grand merci également à Elise P-R pour ces précieux conseils et soutien dans le dépôt du brevet.

Merci également à la team LEBHAM, Mapou, Erwan et Michel, mais aussi à la team de Biodimar et notamment Maryline F. Grâce à toi j'ai pu me lancer dans les purifs de flash et CPC ;) Merci à Nelly pour ton dynamisme et ta motivation sur le MALDI ! Merci également à Stéphane C. pour les nombreuses heures à passer les crèmes en RMN et tes conseils avisés!! 😊

Je tiens maintenant à remercier les nombreuses personnes que j'ai rencontrées au labo. Tout d'abord, mes copinettes Alex & Marinette, merci pour ces moments passés avec vous, cette thèse n'aurait pas eu la même saveur sans vous ! Merci ma petite Alex, pour ces innombrables pauses qui ont été de véritables respirations, surtout à la fin ;) Un grand merci à la tribu des doctorants léMariennes, Kévin T., William H., Marc L., Margaux M.-R., Justine C., Valentin F., Aurel B., Nico D., Jordan T., Manon B., Guillaume B., Justine D., Sarah I., Julien M., Pierre C... J'ai beaucoup apprécié

passer ces 3 ans et + à vos côtés ! Merci à mes super copains algo, ma ptite Fanny L. et Thomas B. alias Toto, j'ai passé de délicieux moments en votre compagnie, merci pour ces bonnes tranches de rire en votre compagnie, si vous n'aviez pas été là, cette thèse n'aurait pas du tout été la même... Force et courage à vous pour ce qui vous attend aussi :D tellement contente d'avoir pu aller en congrès en Corée avec vous, ce sont des souvenirs inoubliables. Je n'oublie pas non plus Gwladys S. et Klervi L. qui ont été là au tout début de ma thèse et qui m'ont donné plein de conseils pour me lancer dans ces 3 années d'aventure ☺ Merci à Sylvain Pétek, notamment pour son aide précieuse sur l'ASE ☺ Merci également à Céline Hubert pour tes quelques mois avec nous et d'avoir su braver les enzymes ! Merci également à mes stagiaires, notamment Mélina G. avec qui j'ai appréciée travailler.

Et puis cette thèse a été un moment qui n'aurait pas été le même sans les rencontres du LEMAR : merci pour ces différents moments passés avec vous, que ce soit les parties de ping-pong endiablées du midi, les raclettes de Noël, les soirées ping-punch, les pauses dehors au soleil avec vous, les repas à la salle de convivialité : Nelly L. (partenaire de danse, merci pour ces quelques parties de danse endiablées !), Anne-Laure C., Hugo B., Myrina B., Clément A., Christophe L., Gauthier S., Olivier G., Seb A., Adeline B., François D., Seb H., Anne-So P., Gene C. ...!

Merci à mes supers copains de bureau, j'ai beaucoup apprécié être avec vous, on avait une bonne ambiance tout en arrivant à avoir une ambiance de travail au top. Une petite pensée particulier aux plus « anciens » du bureau, Valentin F. et Fanny K., où on a partagé beaucoup de chose ensemble, c'était vraiment chouette ! Merci aussi pour les moments qui ont suivi à Sarah I. et Pierre C. ☺

Merci à mes copains qui m'ont toujours soutenu. Je pense très fortement à Lauriane (super copine de course !!) & Léo qui étaient présents au tout de début de ma thèse, c'était agréable de passer des moments avec vous, et j'espère vous revoir très vite ☺

Merci à ma super copinette Popo, pour les nombreuses sorties sportives avec toi, pour la course à pied et puis ensuite pour les nombreuses soirées passés dans les salles d'escalade. Un grand merci aussi à Hugo B. pour les grimpes et les bonnes tranches de rigolade ! Qu'est-ce que l'on s'est marré !! ☺

Merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu à fond dans ce que je fais ! Merci à mon frère de m'avoir donné les meilleurs conseils et tips pour cette thèse et pour son soutien infaillible (le boss de R !). Bien évidemment merci à ma sœur jumelle, ma meilleure amie, toujours là, toujours présente, ça me gonfle d'énergie à chaque fois. Merci à ma famille également, à mes mamies et mes cousins <3 Des pensées à mon Papi, comme j'aurais aimé que tu sois là...

Et puis, bien sûr, le meilleur, Gabin, à mes côtés pendant ses 3 ans de thèse, à profiter pleinement de tout, de la vie, merci pour tout, et pour ton soutien pendant les derniers jours de rédaction ☺ je vais pouvoir me remettre sérieusement à bosser dans le potager ;)

Table des matières

Liste des figures-----	iii
Liste des tableaux-----	ix
Liste des abbréviations-----	x
Avant-propos-----	1
Chapitre 1 : Les algues, une ressource d'intérêt industriel et modèles étudiés-----	8
1 La ressource algale : focus sur les algues brunes-----	9
1.1 Les algues-----	9
1.2 Les algues brunes ou Phaeophyceae-----	10
1.2.1 Définitions-----	10
1.2.2 Répartition des macroalgues brunes bretonnes sur l'estran-----	11
1.2.3 Cycle de vie des macroalgues brunes-----	12
2 Les métabolites algaux et leur variabilité : focus sur les composés phénoliques : <i>publication soumise</i> -----	17
3 Le tissu industriel et intérêts des algues brunes-----	60
3.1 Quelques chiffres sur la production de macroalgues-----	60
3.2 Utilisations principales des macroalgues-----	64
3.3 Accessibilité à la ressource-----	71
4 Les modèles biologiques utilisés dans la thèse-----	73
4.1 Espèces étudiées-----	73
4.2 Récolte et séchage des macroalgues utilisées dans ce projet-----	88
4.3 Bilan des teneurs et types de composés phénoliques dans les modèles étudiés-----	90
Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale-----	95
1 Introduction-----	96
2 Comparaison de méthodes d'extraction et de purification pour obtenir des fractions enrichies en composés phénoliques-----	101
2.1 Matériels et méthodes-----	101
2.2 Résultats-----	115
2.2.1 Intérêt de combiner l'extraction accélérée par solvant et l'extraction en phase solide pour générer des polyphénols actifs marins à partir de deux algues brunes : <i>publication à soumettre</i> -----	101
2.2.2 La Flash-Chromatographie-----	144
2.2.3 La Chromatographie de Partage Centrifuge-----	147
2.2.4 Comparaison des méthodes d'extraction et de purification des composés phénoliques-----	153
2.2.5 Discussion-----	154
2.2.6 Conclusion-----	158
2.2.7 Données supplémentaires-----	158

3	Méthodes d'identification des composés phénoliques-----	160
3.2	Matériels et méthodes-----	163
3.3	Résultats et discussions-----	168
3.3.1	HPLC-----	168
3.3.2	MALDI-TOF/TOF-----	182
3.4	Conclusion-----	183
Chapitre 3 : Quelle ressource algale pour la valorisation en cosmétique ?-----		184
1	Introduction-----	185
2	Les stades précoces ou stades filamenteux, nouvelles ressources innovantes pour la cosmétique ?-----	186
2.1	Généralités-----	186
2.2	Matériels et méthodes-----	189
2.3	Résultats-----	197
2.4	Discussion-----	207
2.5	Conclusion -----	212
3	Variations saisonnières des phlorotannins actifs suivie par la RMN du proton et des tests <i>in vitro</i> : <i>publication en cours de soumission</i> -----	213
Chapitre 4 : Valorisation des algues en cosmétique : activités anti-âge et stabilité des composés phénoliques-----		237
1	Introduction-----	238
2	Des activités anti-âge déterminées par des tests enzymatiques-----	243
2.1	Généralités sur la peau-----	243
2.2	Matériels et méthodes-----	246
2.3	Résultats et discussions-----	252
2.4	Conclusion-----	261
3	Stabilité des composés phénoliques-----	263
3.1	Stabilité des composés phénoliques dans un extrait sec-----	263
3.2	Stabilité des composés phénoliques dans une crème cosmétique : <i>publication à soumettre</i> -----	268
4	Brevet : extraits d'algues brunes comprenant des composés phénoliques et leurs utilisations cosmétiques-----	284
Conclusions et perspectives-----		286
Bibliographie-----		292
Annexe-----		327

Liste des figures

Chapitre 1: Les algues, une ressource d'intérêt industriel et modèles étudiées.	page
Figure 1-1 : Relations phylogénétiques entre les 3 grandes lignées, Archées, Eubactéries et Eucaryotes avec les 4 grands groupes de macroalgues encadrés : les Phaeophyceae ou algues brunes, les Chlorophytes ou algues vertes, les Rhodophyceae ou algues rouges et les Cyanobacteria ou algues bleues.	9
Figure 1-2 : Répartition des algues brunes sur l'estran breton en mode battu (sur la gauche) et en mode abrité (sur la droite). PMVE : pleine mer de vive-eau ; PMME : pleine mer de morte-eau ; BMME : basse mer de morte-eau ; BMVE : basse mer de vive-eau ; Zéro des cartes : niveau des plus basses mers ; Ae : <i>Alaria esculenta</i> ; An : <i>Ascophyllum nodosum</i> ; Bb : <i>Bifurcaria bifurcata</i> ; Fs : <i>Fucus serratus</i> ; Fsp : <i>Fucus spiralis</i> ; Fv : <i>Fucus vesiculosus</i> ; Fv ev : <i>Fucus vesiculosus evesiculosus</i> ; Hs : <i>Halidrys siliquosa</i> ; He : <i>Himanthalia elongata</i> ; Ld : <i>Laminaria digitata</i> ; Lh : <i>Laminaria hyperborea</i> ; Lo : <i>Laminaria ochroleuca</i> ; Pc : <i>Pelvetia canaliculata</i> ; Sl : <i>Saccharina latissima</i> ; Sp : <i>Saccorhiza polyschides</i> (D'après Floc'h, 1964).	11
Figure 1-3 : Cycle de reproduction de <i>Fucus serratus</i> (Gayral, 1966).	13
Figure 1-4 : Cycle de reproduction de <i>Saccharina japonica</i> , modifié de Lee (1999).	14
Figure 1-5 : Cycle de reproduction d' <i>Ectocarpus siliculosus</i> , modifié de De Reviere (2002).	15
Figure 1-6 : Carte de la zone côtière atlantique de la France représentant les zones de production des macroalgues en France par Mesnildrey et al. (2012), modifié par Lesueur & Comparini (2015).	61
Figure 1-7 : Utilisation des algues dans le monde et en France (FAO, 2014 ; Lesueur & Comparini, 2015).	64
Figure 1-8 : Molécules algales valorisées dans les différents domaines industriels (De Reviere, 2003).	65
Figure 1-9 : Principe du Protocole de Nagoya (inspiré de Wittmann, 2015).	72
Figure 1-10 : Classification d' <i>Ascophyllum nodosum</i> (Linnaeus) Le Jolis. Photo ©F. Lalegerie	73
Figure 1-11 : Biomasse d' <i>Ascophyllum nodosum</i> récoltée par année dans les départements du Finistère et des Côtes d'Armor ainsi que dans toute la Bretagne selon les données du CRPMEM et Mesnildrey et al. (2012). Absence de données pour 2011, 2011 et 2013. Nd = absence de données pour 2011, 2012 et 2013.	75
Figure 1-12 : Classification de <i>Bifurcaria bifurcata</i> R. Ross. Photo ©F. Lalegerie	77
Figure 1-13 : Classification de <i>Fucus serratus</i> (Linnaeus). Photo ©M.D. Guiry	78
Figure 1-14 : Classification d' <i>Halidrys siliquosa</i> (Linnaeus) Lyngbye. Photo ©M.D. Guiry	80
Figure 1-15 : Classification d' <i>Himanthalia elongata</i> (Linnaeus) Gray. Photo ©T. Burel	81
Figure 1-16 : Biomasse d' <i>Himanthalia elongata</i> récoltée par année dans les départements du Finistère et des Côtes d'Armor ainsi que dans toute la Bretagne selon le CRPMEM et Mesnildrey et al. (2012). Absence de données en 2011, 2012, 2013 et 2014.	82
Figure 1-17 : Classification d' <i>Alaria esculenta</i> (Linnaeus) Greville. Photo ©M.D. Guiry	83
Figure 1-18 : Classification de <i>Laminaria ochroleuca</i> Bachelot de la Pylaie. Photo ©I. Bárbara	84
Figure 1-19 : Classification d' <i>Undaria pinnatifida</i> (Harvey) Suringar. Photo ©M.D. Guiry	85
Figure 1-20 : Classification d' <i>Ectocarpus siliculosus</i> (Dillwyn) Lyngbye. Photo ©D. Littler	87
Figure 1-21 : Carte de la Bretagne montrant les carroyages pour la récolte des algues. Le carroyage numéro 31 a été entouré en rouge puisque 4 macroalgues brunes ont été récoltées dans cette zone (modifiée d'après Chambre Syndicale des Algues, http://www.chambre-syndicale-algues.org/images/file/recolte-a-pied/carroyage-a3.pdf).	88
Figure 1-22 : Utilisation des algues lors de cette étude soit récoltées à l'état sauvage (à gauche), soit cultivées en "free-living" (à droite). Ae = <i>Alaria esculenta</i> , An = <i>Ascophyllum nodosum</i> , Bb = <i>Bifurcaria</i>	89

<i>bifurcata</i> , Es = <i>Ectocarpus siliculosus</i> , Fs = <i>Fucus serratus</i> , Hs = <i>Halidrys siliquosa</i> , He = <i>Himanthalia elongata</i> , Lo = <i>Laminaria ochroleuca</i> , Up = <i>Undaria pinnatifida</i>	
Figure 1-23 : Type de phlorotannins retrouvés chez les macroalgues brunes étudiées. An : <i>Ascophyllum nodosum</i> , Fs : <i>Fucus serratus</i> , Bb : <i>Bifurcaria bifurcata</i> , Hs : <i>Halidrys siliquosa</i> , He : <i>Himanthalia elongata</i> , Lo : <i>Laminaria ochroleuca</i> , Up : <i>Undaria pinnatifida</i> , Ae : <i>Alaria esculenta</i> , Es : <i>Ectocarpus siliculosus</i> , DP = degré de polymérisation.	94
Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale	
Figure 2-1 : De l'algue à la fraction : méthodes permettant d'obtenir des fractions enrichies en composés phénoliques identifiés (Le Lann et al., 2012 ; Steevensz et al., 2012 ; Hardouin et al., 2014 ; Stiger-Pouvreau et al., 2014 ; Tanniou et al., 2013 ; Esquivel-Hernández et al., 2017 ; Vissers et al., 2017 ; Cikoš et al., 2018 ; Creis et al., 2018 ; Gallego et al., 2018 ; Gonçalves-Fernández et al., 2019).	96
Figure 2-2 : Les six principes de l'extraction verte pour l'obtention de substances naturelles, selon Chemat et al. (2012).	97
Figure 2-3 : Schéma modifié de Richter et al. (1996) du système d'extraction accélérée par solvant (ASE) ainsi que les photographies des deux appareils utilisés, l'ASE 150 au LEMAR et l'ASE 300 à la Plateforme Biodimar (Dionex™ ASE™).	103
Figure 2-4 : Schéma des différentes étapes de la méthode d'extraction en phase solide (SPE), inspiré d'Humbert (2010), ainsi qu'une photographie du système SPE utilisé (Vac Elut SPS 24, Agilent Technologies, Etats-Unis).	105
Figure 2-5 : Protocole de l'extraction en phase solide (SPE) appliquée à un extrait brut d' <i>Halidrys siliquosa</i> ou d' <i>Ascophyllum nodosum</i> obtenu par extraction accélérée par solvant (ASE 150). H ₂ O : eau distillée, EtOH : éthanol, DCM : dichlorométhane.	106
Figure 2-6 : A gauche : Protocole de la flash-chromatographie appliquée à un extrait brut d' <i>Halidrys siliquosa</i> obtenu par extraction accélérée par solvant (ASE 300 de la plateforme Biodimar). H ₂ O = Eau milliQ, MeOH = méthanol, EtOH = éthanol (utilisé à différentes dilution dans de l'eau distillée), DCM = dichlorométhane (utilisé pur et dilué de moitié dans de l'éthanol). A droite : Chromatographie Flash/UV Spot Flash d'Armen Instrument (France) de la plateforme Biodimar.	107
Figure 2-7 : A : Schéma des cellules présentes dans la colonne de l'appareil de Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC), en mode ascendant, dans le cas de figure des molécules A, B et C, dépendant de la valeur du coefficient de partage Kd. B : Schéma des différents modes d'élution possibles en Chromatographie de Partage Centrifuge : mode ascendant ou mode descendant.	109
Figure 2-8 : Schéma récapitulatif des méthodes d'extraction et de purification mises en place dans cette étude sur <i>Ascophyllum nodosum</i> et <i>Halidrys siliquosa</i> . ASE 150 : réalisée sur l'appareil du LEMAR ; ASE 300 : réalisée sur l'appareil de la Plate-forme BIODIMAR.	111
Figure 2-9 : Teneurs en composés phénoliques (TCP, mg.g ⁻¹ d'extrait sec) des fractions obtenues par Flash-Chromatographie (FC) sur un extrait brut (ASE) d' <i>Halidrys siliquosa</i> . Les lettres indiquent une différence significative entre les différentes fractions (Kruskal-Wallis, PMCMR, <i>p</i> < 0,05). H ₂ O = eau milliQ, EtOH = éthanol (utilisé pur ou dilué dans l'eau milliQ).	144
Figure 2-10 : Spectres ¹ H RMN des fractions obtenues par Flash-Chromatographie (FC) à partir d'un extrait brut (ASE) d' <i>Halidrys siliquosa</i> . H ₂ O = eau milliQ, EtOH = éthanol. L'encadré bleu représente la zone des composés aromatiques.	145
Figure 2-11 : Activités antiradicalaire (DPPH ; IC50 ; mg.mL ⁻¹ ; histogramme) et antioxydante (FRAP ; EC50 ; mg.mL ⁻¹ ; point) des fractions obtenues par Flash-Chromatographie (FC) à partir d'un extrait brut (ASE) d' <i>Halidrys siliquosa</i> .	146
Figure 2-12 : Photographies des 4 mélanges biphasiques réalisés avec l'extrait ASE d' <i>Halidrys siliquosa</i> pour déterminer le système optimal de solvants pour l'extraction de partage centrifuge, par la méthode « shake flask ». 1 = acétate d'éthyle:eau (1:1 ; v:v), 2 = hexane:acétate d'éthyle:méthanol:eau (1:9:2:8 ; v:v), 3 = hexane:acétate d'éthyle:éthanol/eau (1:8:2:7 ; v : v), 4 =	147

heptane:acétate d'éthyle:méthanol:eau (19:1:19:1 ; v:v).A noter une limpidité des phases acétate d'éthyle., contrairement aux phases inférieures.	
Figure 2-13 : Chromatographies sur Couche Mince (CCM) effectuées sur les phases supérieures et inférieures des 4 solutions biphasiques obtenues avec l'extrait ASE d' <i>Halidrys siliquosa</i> (cf Figure 2-12) : une première plaque CCM sur laquelle a été vaporisée une solution de DPPH et une deuxième plaque CCM qui a été éluée dans un mélange chloroforme:méthanol (CHLF:MetOH ; v:v) et révélée à 365 nm. Les cercles bleus sur la 1 ^{ère} CCM correspondent aux halos autour des dépôts. 1S = phase supérieure de la solution 1, 1I = phase inférieure de la solution 2, 2S = phase supérieure de la solution 2, etc...	148
Figure 2-14 : Chromatogrammes obtenus à une longueur d'onde de 254 nm pour la CPC1 (en bleu) et à 280 nm pour la CPC2 (en vert) à partir d'un extrait ASE d' <i>Halidrys siliquosa</i> . Les numéros correspondent aux fractions retenues pour les analyses suivantes.	149
Figure 2-15 : Spectres ¹ H RMN des fractions présentant des composés phénoliques, obtenues par deux Chromatographies de Partage Centrifuge : CPC1 (collecte de fractions tous les 9 mL et suivi de la DO à des longueurs d'onde de 190 et 254 nm) ou CPC2 (collecte de fractions tous les 25 mL et suivi de la DO à des longueurs d'onde de 240, 270 et 280 nm). Les fractions diluées dans le méthanol deutéré (MeOD) correspondent aux phases supérieures (qui étaient dans l'acétate d'éthyle). Afin, de mieux observer la zone des composés aromatiques, un zoom (à droite) a été effectué.	150
Figure 2-16 : Teneurs en composés phénoliques (TCP, mg.g ⁻¹ d'extrait) de certaines fractions de Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC1 ou CPC2) à partir d'un extrait brut (ASE 300) d' <i>Halidrys siliquosa</i> . S = phase supérieure ; I = phase inférieure. Les lettres indiquent une différence significative entre les différentes fractions (Kruskal-Wallis, p < 0,05, n=3).	151
Figure 2-17 : Activités antiradicalaires (DPPH ; IC50 ; mg.mL ⁻¹ ; histogramme) et réductrices (FRAP ; EC50 ; mg.mL ⁻¹ ; point) de certaines fractions obtenues par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC1 ou CPC2) à partir d'un extrait brut (ASE) d' <i>Halidrys siliquosa</i> . Résultats statistiques en données supplémentaires.	152
Figure 2-18 : Comparaison des activités antioxydantes - anti-radicalaire (IC50 ; mg.mL ⁻¹) et réductrice (EC50 ; mg.mL ⁻¹) - et de la teneur en composés phénoliques (TCP ; mg.g ⁻¹ d'extrait) obtenues après différentes méthodes d'extraction et de purification effectuées sur <i>Halidrys siliquosa</i> : MAC = macération, ASE = extraction accélérée par solvant, LL = purification liquide/liquide, SPE = extraction en phase solide, FC = flash-chromatographie, CPC = chromatographie de partage centrifuge. Les deux points ASE correspondent aux extractions avec l'ASE 150 (sur <i>Halidrys siliquosa</i> récoltée en 2016) et l'ASE 300 (sur <i>Halidrys siliquosa</i> récoltée en 2017). Les deux points MAC et LL correspondent à la macération et à la purification LL réalisée sur <i>Halidrys siliquosa</i> récoltée en 2016 et en 2017.	153
Figure 2-19 : Photographie de la chaîne HPLC avec le détecteur DAD sur la gauche.	161
Figure 2-20 : Photographie de la plaque appelée cible (à gauche) ainsi que le spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF de la plateforme de Spectrométrie de Masse de l'UBO (Autoflex III, Bruker, Etats-Unis) (à droite).	162
Figure 2-21 : Structure de composés phénoliques : phloroglucinol, pyrogallol et acide gallique.	163
Figure 2-22 : Protocole de la méthode de macération suivie de l'ultrafiltration.	164
Figure 2-23 : Gradient de solvants de la méthode n°1 avec le solvant A, l'eau contenant 0,1% d'acide formique, et le solvant B, l'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique.	166
Figure 2-24 : Chromatogrammes des différents standards séparés (1 mg.mL ⁻¹ chacun) ou mélangés (1:1:1, v:v) : phloroglucinol, pyrogallol et acide gallique. Ils ont été obtenus avec la méthode instrumentale n°1 et ont été zoomés sur les 4 et 6 premières minutes de l'analyse. * = impuretés ?	168
Figure 2-25 : Gammes étalon du phloroglucinol (en bleu) et du pyrogallol (en orange).	169
Figure 2-26 : Chromatogrammes obtenus avec l'extrait brut méthanolique de <i>Fucus serratus</i> (5 mg.mL ⁻¹) en utilisant la méthode instrumentale n°1. Les chromatogrammes du bas correspondent à des zooms de ceux du haut entre 0 et 4 min (à gauche) et entre 55 et 65 min (à droite). Ph = phloroglucinol, * = impuretés ?	170

Figure 2-27 : Chromatogrammes obtenus avec l'extrait brut méthanolique de <i>Fucus serratus</i> (5 mg.mL ⁻¹) en utilisant 4 méthodes instrumentales avec des temps d'analyses différents : test 1 = 66 min, test 2 = 40 min, test 3 = 28 min et test 4 = 16 min. Les chromatogrammes du bas correspondent à des zooms de ceux du haut entre 0 et 4 min. Ph = phloroglucinol	171
Figure 2-28 : Chromatogrammes obtenus avec l'extrait brut méthanolique obtenu par macération de <i>Fucus serratus</i> (MAC Fs ; 5,0 mg.mL ⁻¹) et la fraction purifiée par purification liquide/liquide enrichie en composés phénoliques (LL Hs ; 5,3 mg.mL ⁻¹) en utilisant la méthode instrumentale n°4 (16 min). Ph = phloroglucinol	173
Figure 2-29 : Chromatogrammes obtenus avec l'extrait brut méthanolique de <i>Fucus serratus</i> (5 mg.mL ⁻¹) en utilisant la méthode n°4 en changeant l'acide dans le solvant A à une concentration de 0,1 % : AcF = acide formique, AcFNew = acide formique d'une bouteille neuve, AcAc = acide acétique. Ph = phloroglucinol	174
Figure 2-30 : Chromatogrammes obtenus avec la fraction purifiée d' <i>Halidrys siliquosa</i> (5,3 mg.mL ⁻¹) en utilisant la méthode n°4 en modifiant le pourcentage d'acide formique dans le solvant A de la phase mobile. Eau = 0 % d'acide formique dans le solvant A, AcF 0,05 % = 0,05 % d'acide formique, AcF 0,1 % = 0,1 % d'acide formique.	175
Figure 2-31 : Chromatogrammes obtenus avec la fraction purifiée enrichie en composés phénoliques d' <i>Halidrys siliquosa</i> (5,3 mg.mL ⁻¹) en utilisant différentes températures de colonne : 25°C (méthode n°5), 32°C (méthode n°6) et 40°C (méthode n°3).	176
Figure 2-32 : Chromatogrammes des différentes fractions obtenues par ultrafiltration à partir de l'extrait brut de <i>Fucus serratus</i> en utilisant la méthode n°1 : l'extrait brut (EB), les rétentats supérieurs à 50 kDa (R50K), à 10 kDa (R10K), à 3 kDa (R3K) et le filtrat inférieur à 3 kDa (F3K). Ph = phloroglucinol	178
Figure 2-33 : Chromatogrammes des différentes fractions obtenues par ultrafiltration à partir de l'extrait brut d' <i>Halidrys siliquosa</i> en utilisant la méthode n°1 : l'extrait brut (EB), les rétentats supérieurs à 50 kDa (R50K), à 10 kDa (R10K), à 3 kDa (R3K) et le filtrat inférieur à 3 kDa (F3K). Ph = phloroglucinol	179
Figure 2-34 : Chromatogrammes de fractions obtenues par Flash-Chromatographie à partir de l'extrait brut ASE d' <i>Halidrys siliquosa</i> en utilisant la méthode n°6 (28 min, 32°C). EtOH = éthanol.	180
Figure 2-35 : Spectre obtenu par MALDI-TOF/TOF de la fraction purifiée par purification liquide/liquide d'un extrait de <i>Fucus serratus</i> .	182
Chapitre 3 : Quelle ressource algale pour la valorisation en cosmétique ?	
Figure 3-1 : Cycles de reproduction des <i>Ectocarpales</i> vs <i>Laminariales</i> modifiés de Fletcher (2011). Les cercles verts entourent les phases utilisées en culture « free-living » et donc correspondant aux SP.	187
Figure 3-2 : Photographies prises au microscope optique des 3 stades précoces d' <i>Alaria esculenta</i> , <i>Undaria pinatifida</i> et <i>Ectocarpus siliculosus</i> obtenues au grossissement 50 et 400.	189
Figure 3-3 : Protocole de l'extraction solide/liquide en cascade menée sur des stades précoces (SP) d' <i>Undaria pinatifida</i> conditionnées dans 4 états différents : frais, congelé, lyophilisé ou séché à l'étuve à 30°C.	191
Figure 3-4 : Différentes méthodes de fragmentation et d'extraction testées sur les stades précoces (SP) d' <i>Undaria pinatifida</i> et d' <i>Alaria esculenta</i> et les analyses effectuées sur les extraits obtenus (notés en bleu) représentées par les étoiles : l'étoile orange correspond au dosage des composés phénoliques par le test du Folin-Ciocalteu et la mesure de l'activité antioxydante par le test du DPPH, l'étoile verte correspond à une observation au microscope optique.	193
Figure 3-5 : Les différentes étapes pour obtenir le milieu Provasoli, modifié d'après Starr & Zeikus (1993).	194
Figure 3-6 : Expérience d'orientation métabolique en plaçant des stades précoces (SP) dans des bacs ayant deux conditions de culture différentes c'est-à-dire exposés à différentes qualités de lumière : une condition exposée à la lumière visible avec des longueurs d'onde supérieures à 400 nm (VIS), une autre condition exposée aux radiations UVA (entre 320 et 400 nm) + lumière visible (UV).	195

Figure 3-7 : Teneurs en composés phénoliques (TCP) des extraits d' <i>Undaria pinnatifida</i> obtenus après macération à l'eau, à l'éthanol ou à l'acétone sur des stades précoces (SP) frais (F), congelées (C), lyophilisées (L) ou séchées à l'étude à 30°C (S). Les lettres indiquent une différence significative entre les différentes fractions à l'eau (ANOVA à un facteur, $p < 0,001$) et entre les différentes fractions éthanoliques (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$). Les étoiles indiquent une différence significative entre les 3 solvants différents (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$, $n=3$).	197
Figure 3-8 : Activité anti-radicalaire d'après le test du DPPH des extraits d' <i>Undaria pinnatifida</i> obtenus après macération à l'éthanol sur des stades précoces (SP) fraîches (F), congelées (C), lyophilisées (L) ou séchées à l'étuve à 30°C (S). Les lettres indiquent une différence significative entre les différents extraits et témoins positifs (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$, $n=3$).	198
Figure 3-9 : Photographies prises en microscopie électronique des stades précoces (SP) d' <i>U. pinnatifida</i> après avoir subies différentes méthodes de fragmentation et d'extraction décrites dans la (Figure 3-4). Grossissement du microscope à x50 pour les photos de gauche et à x400 pour les photos de droite. Les flèches désignent les fragmentations des SP et les débris cellulaires vidés de leur contenu.	200
Figure 3-10 : Photographies prises en microscopie électronique des CSP d' <i>Undaria pinnatifida</i> après avoir subies différentes méthodes de fragmentation et d'extraction décrites dans la (Figure 3-4). Grossissement du microscope à 50 pour les photos de gauche et à 400 pour les photos de droite. Les flèches désignent les fragmentations des SP et les débris cellulaires vidés de leur contenu.	201
Figure 3-11 : Photographies prises en microscopie électronique des stades précoces (SP) d' <i>Alaria esculenta</i> après avoir subi différentes méthodes de fragmentation et d'extraction décrites dans la (Figure 3-4). Grossissement du microscope à 50 pour les photos de gauche et à 400 pour les photos de droite. Les flèches désignent les fragmentations des SP et les débris cellulaires vidés de leur contenu.	202
Figure 3-12 : Teneurs en composés phénoliques des extraits de stades précoces (SP) d' <i>U. pinnatifida</i> (en bleu) et d' <i>A. esculenta</i> (en orange) après différentes techniques de fragmentation et d'extraction (voir détails de la codification des techniques de fragmentation Figure 3-4). Les lettres indiquent une différence significative entre les extraits pour <i>U. pinnatifida</i> (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$, $n=3$).	203
Figure 3-13 : Photographies prises au microscope à épifluorescence des stades précoces (SP) d' <i>Ectocarpus siliculosus</i> et d' <i>Undaria pinnatifida</i> après 1 semaine (T1) et 3 semaines de culture (T3) sans UV (à gauche) et avec UV (à droite). Les échelles n'ont pas été indiquées sur toutes les photographies.	204
Figure 3-14 : Teneurs en composés phénoliques (TCP) quantifiées par le test du Folin-Ciocalteu des extraits d' <i>E. siliculosus</i> (en haut) et d' <i>U. pinnatifida</i> (en bas) obtenus après la combinaison de cryobroyage, ultrasons et macération. Ces extraits ont été obtenus après 3 semaines de culture sous forte exposition aux UV (T3 UV) ou non (T3 VIS) et au départ de la culture (T0). Les lettres indiquent une différence significative entre les extraits (Kruskal-Wallis, $p = 0,024$ pour <i>E. siliculosus</i> ; ANOVA à un facteur, $p = 0,068$ pour <i>U. pinnatifida</i>).	205
Figure 3-15 : Activité antiradicalaire par le test du DPPH des extraits d' <i>E. siliculosus</i> et <i>U. pinnatifida</i> obtenus après 3 semaines de culture sous UV (T3 UV) ou non (T3 VIS) et au lancement de la culture (T0). Les lettres indiquent une différence significative entre les extraits, en bleu pour <i>E. siliculosus</i> et en vert pour <i>U. pinnatifida</i> (Kruskal-Wallis, $p = 0,019$ pour <i>E. siliculosus</i> et $p = 0,066$ pour <i>U. pinnatifida</i>).	206
Chapitre 4 : Valorisation des algues en cosmétique : activités anti-âge et stabilité des composés phénoliques	
Figure 4-1: Croissance du marché cosmétique mondial entre 2009 et 2018 (Source: https://www.loreal-finance.com/fr/rapport-annuel-2018/marche-cosmetique-2-1/).	236

Figure 4-2 : Répartition du marché mondial des produits cosmétiques en 2018 par zones géographiques (à gauche) et par catégories de produits (à droite) (https://www.loreal-finance.com/fr/rapport-annuel-2018/marche-cosmetique-2-1/).	237
Figure 4-3 : Pourcentage sur l'usage journalier de produits anti-âge selon les générations en 2017, au niveau mondial (https://fr.statista.com/statistiques/785526/usage-journalier-produits-anti-age-par-generation-monde/).	238
Figure 4-4 : Part des femmes ayant acheté des produits cosmétiques biologiques en France entre 2010 et 2018 (à gauche) et le Chiffre d'affaires (CA) du secteur des produits de beauté écologiques et biologiques en France (https://fr.statista.com/).	239
Figure 4-5 : Schéma des différentes couches qui constituent la peau : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (inspiré d'Acar L., Com. Pers.).	241
Figure 4-6 : Cinétiques de l'absorbance à 410 nm obtenues avec différentes concentrations d'enzyme (élastase ; 0,5 ; 1,0 ; 2,0 et 4,0 U.mL ⁻¹) et une concentration de substrat de 4,4 mM lors du test anti-élastase (protocole n°3). Les courbes de tendance correspondant aux courbes à la tangente sont également représentées avec les équations respectives.	250
Figure 4-7 : Cinétiques de l'absorbance à 410 nm obtenues avec différentes concentrations de substrat (2,2 ; 4,4 ; 6,6 et 8,8 mM) et une concentration en enzyme de 2,0 U.mL ⁻¹ , lors du test anti-élastase (protocole n°3). Les courbes de tendance correspondant aux courbes à la tangente sont également représentées avec les équations respectives.	251
Figure 4-8 : Pourcentage d'inhibition de l'élastase par des extraits bruts d' <i>Ascophyllum nodosum</i> (An), <i>Fucus serratus</i> (Fs) et <i>Halidrys siliquosa</i> (Hs) obtenus par macération (A) ou par extraction accélérée par solvant ASE (B), à différentes concentrations (mg.mL ⁻¹). L'activité de l'EGCG a seulement été obtenue pour la concentration 1 mg.mL ⁻¹ . Seule la fraction ASE Fs et l'EGCG ont été réalisés avec n=3, les autres fractions à n=1.	253
Figure 4-9 : Cinétiques de l'absorbance à 475 nm obtenues à différentes concentrations d'enzymes (250, 500, 750, 1000 et 1250 U.mL ⁻¹) et une concentration de substrat de 1,0 mM, lors du test anti-tyrosinase (protocole n°3). Les courbes de tendance correspondant aux courbes à la tangente sont également représentées avec les équations respectives.	255
Figure 4-10 : Cinétiques de l'absorbance à 475 nm obtenues avec différentes concentrations de substrat (0,5, 1,0 et 1,5 mM) et une concentration d'enzyme de 1250 U.mL ⁻¹ lors du test anti-tyrosinase (protocole n°3). Les courbes de tendance correspondant aux courbes à la tangente sont également représentées avec les équations respectives.	256
Figure 4-11 : Pourcentage d'inhibition de la tyrosinase par des extraits bruts d' <i>Ascophyllum nodosum</i> (An), <i>Fucus serratus</i> (Fs) et <i>Halidrys siliquosa</i> (Hs) obtenus par macération (A) ou par extraction accélérée par solvant ASE (B), à différentes concentrations (mg.mL ⁻¹). Seules les fractions ASE An et Fs et l'acide kojique ont été réalisés avec n=3, les autres fractions à n=1.	258
Figure 4-12 : Spectres RMN ¹ H, focalisés sur la zone des composés phénoliques entre 6,6 et 5,6 ppm, des extraits d' <i>Halidrys siliquosa</i> obtenus par macération (MAC) ou extraction accélérée par solvant (ASE) stockés dans différents conditions de température (-20°C, 4°C, température ambiante TA ou 50°C) et de luminosité (lumière ou obscurité représenté par le soleil et la lune respectivement). Ces spectres ont été obtenus à différents temps de stockage : le jour de l'obtention de l'extrait (D0) et après 30 et 90 jours de stockage (D30 et D90 respectivement).	262
Figure 4-13 : Teneurs en composés phénoliques des extraits obtenus par macération (MAC) et par extraction accélérée par solvant (ASE) d' <i>Halidrys siliquosa</i> déterminées lors de l'obtention de l'extrait (D0) et 30 et 90 jours de stockage dans différentes conditions de température (-20°C, 4°C ; température ambiante TA ou 50°C) et de luminosité (lumière ou obscurité représenté par le soleil et la lune respectivement). Les lettres indiquent une différence significative entre les extraits au cours du temps pour chaque condition indépendamment (ANOVA à un facteur, $p < 0,04$).	263
Figure 4-14 : Activités anti-radicalaires des extraits obtenus par macération (MAC) et par extraction accélérée par solvant (ASE) d' <i>Halidrys siliquosa</i> déterminées lors de l'obtention de l'extrait (D0) et 30 et 90 jours de stockage dans différentes conditions de température (-20°C, 4°C ; température	264

ambiante TA ou 50°C) et de luminosité (lumière ou obscurité représenté par le soleil et la lune respectivement). Les lettres indiquent une différence significative entre les extraits au cours du temps pour chaque condition indépendamment (ANOVA à un facteur, $p < 0,03$).

Figure 4-15: Les différentes étapes d'une demande de dépôt de brevet auprès de l'Institut National de la Propriété Industrielle (INPI), inspiré de <https://www.ipside.com/fr> 284

Liste des tableaux

Chapitre 1: Les algues, une ressource d'intérêt industriel et modèles étudiées.	page
Tableau 1-1 : Tonnages d'algues de rive récoltées à pied, réparties sur les 4 départements bretons : Finistère, Côtes d'Armor, Île-et-Vilaine et Morbihan. ND=non déterminé	62
Tableau 1-2 : Teneurs en composés phénoliques des macroalgues brunes étudiées et littérature associée. ED : eau distillée, MeOH : méthanol, DCM : dichlorométhane, ACT : acétone, AE : acétate d'éthyle, EtOH : éthanol, CHF : chloroforme, HEX : hexane, F-C : dosage du Folin-Ciocalteu.	90
Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale	
Tableau 2-1 : Systèmes de solvants testés pour la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC).	110
Tableau 2-2 : Etapes de la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) appliquée à un extrait brut d' <i>Halidrys siliquosa</i> obtenu par extraction accélérée par solvant (ASE 300).	111
Tableau 2-3 : Productivité (mg de CP.g ⁻¹ .min ⁻¹ .L ⁻¹) calculée pour chaque méthode d'extraction et de purification selon l'équation de Tanniou et al. (2013) . Les résultats des macérations et des purifications LL effectuées sur deux lots d' <i>H. siliquosa</i> (2016 et 2017) ont été poolés.	154
Tableau 2-4 : Différents gradients de solvant mis en place pour tester 6 méthodes instrumentales d'HPLC différentes avec 4 temps d'analyses différents et 3 températures de colonne différentes. Solvant B = Acétonitrile + 0,1 % d'acide formique. Le pourcentage restant correspond au solvant A (eau milliQ + 0,1 % d'acide formique).	166
Chapitre 3 : Quelle ressource algale pour la valorisation en cosmétique ?	
Tableau 3-1 : Activité antioxydante d'après le test du pouvoir réducteur du fer (FRAP) des extraits d' <i>Undaria pinnatifida</i> obtenus après macération à l'éthanol sur des stades précoces (SP) frais (F), congelés (C), lyophilisés (L) ou séchés à l'étuve à 30°C (S). Les lettres indiquent une différence significative entre les différents extraits et témoins positifs (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$, $n=3$).	199
Tableau 3-2 : Activités photoprotectrices exprimées en SPF et en PF-UVA des extraits de CSP obtenus au début du lancement de la culture (T0) et au bout de 3 semaines dans deux conditions de culture différentes, dans le visible (T3 VIS) et sous UV (T3 UV).	207
Chapitre 4 : Valorisation des algues en cosmétique : activités anti-âge et stabilité des composés phénoliques	
Tableau 4-1 : Les cinq différents protocoles testés lors de l'optimisation du test anti-élastase : différents ordres de dépôts (représenté par les numéros au début de chaque produit), différents volumes ou concentrations, différents temps et température d'incubation, différentes lectures (point final ou cinétique) au spectrophotomètre. T10= 10 minutes après T0.	245
Tableau 4-2 : Volumes des différents réactifs (en µL) du test anti-élastase du protocole n°1 pour les différents échantillons.	246
Tableau 4-3 : Les cinq différents protocoles testés lors de l'optimisation du test anti-tyrosinase : différents ordres de dépôts (représenté par les numéros au début de chaque produit), différents volumes ou concentrations, différents temps et température d'incubation, différentes lectures (point final ou cinétique) au spectrophotomètre. Le réactif A correspond au tampon phosphate.	248
Tableau 4-4 : Protocole final du test anti-élastase.	252
Tableau 4-5 : Protocole final du test anti-tyrosinase. Le réactif A correspond au tampon phosphate.	257

Liste des abréviations

ASE : Accelerated Solvent Extraction

CPC : Chromatographie de Partage Centrifuge

CP : Composés phénoliques

FC : Flash-Chromatographie

LL : Liquide/Liquide

MAC : MACération

SM : Spectrométrie de Masse

SPE : Solid Phase Extraction

TPC : Total Phenolic Content

TCP : Teneur en Composés Phénoliques

Avant-propos

Le projet RIV-AGE 2.0

Le projet RIVAGE 2.0 (2015-2020) est un projet collaboratif financé dans le cadre du 20^{ème} Appel à projets du Fonds Unique Interministériel (FUI20) publié en 2015. Ce projet d'une durée de 42 mois a pour objectif la recherche et la valorisation d'ingrédients actifs marins d'origine végétale aux propriétés anti-âge. Le projet RIV-AGE 2.0 a été monté par la société Science et Mer, en étroite collaboration avec le LEMAR-IUEM-UBO. Rachetée aujourd'hui, c'est actuellement la société Technature qui pilote le projet. Les partenaires du projet sont de 2 types : industriels avec Technature, C-Weed Aquaculture et Chimex et académiques avec les Universités de Bretagne Occidentale (UBO) et de Nantes (UN). Les différents partenaires sont répartis en Bretagne, Pays de la Loire et région parisienne (Figure A).

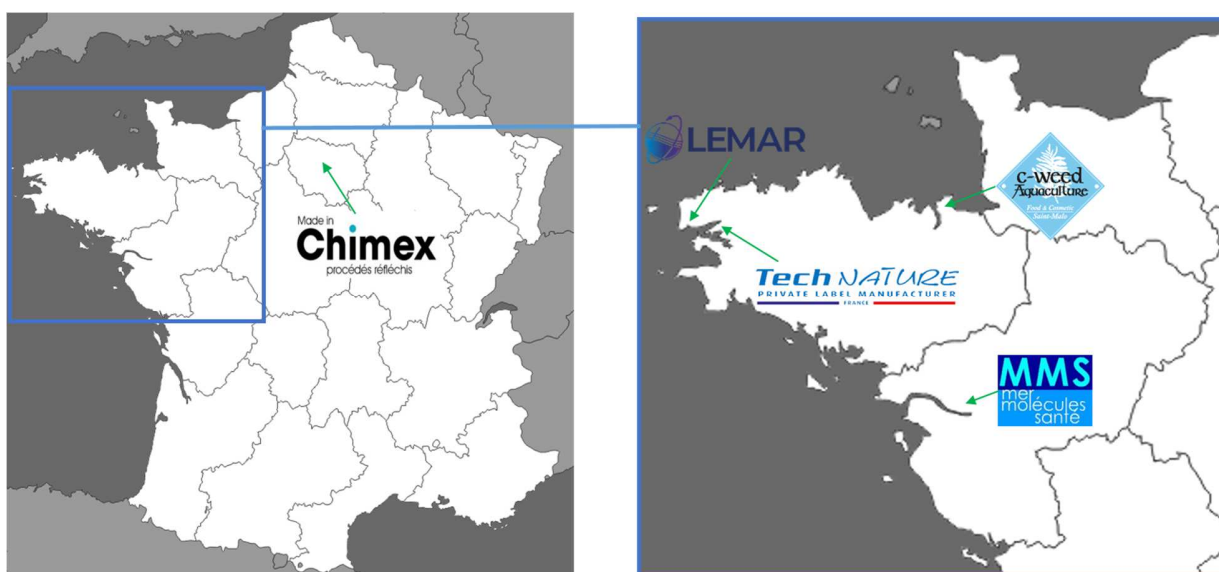


Figure A: Les différents partenaires du projet RIV-AGE 2.0 sur le territoire français: C-Weed Aquaculture, LEMAR, Technature, MMS et Chimex.

RIVAGE 2.0 a été labellisé par deux pôles de compétitivité, le Pôle Mer Bretagne Atlantique (septembre 2013) et Cosmetic Valley (mai 2015) et financé par divers organismes, BPI France, le Conseil Régional de Bretagne, le Conseil Départemental du Finistère, Brest Métropole ainsi que Saint-Malo Agglomération. Il intègre toute la chaîne de valeur de production d'un produit cosmétique : de la récolte/culture de la biomasse sélectionnée pour sa composition particulière en composés phénoliques actifs, à l'extraction de nouveaux actifs par des procédés éco-responsables innovants, jusqu'au développement de formulations cosmétiques répondant à des problématiques non comblées sur le marché. Les différents partenaires, leurs compétences et leurs interactions, sont représentés sur la Figure B.

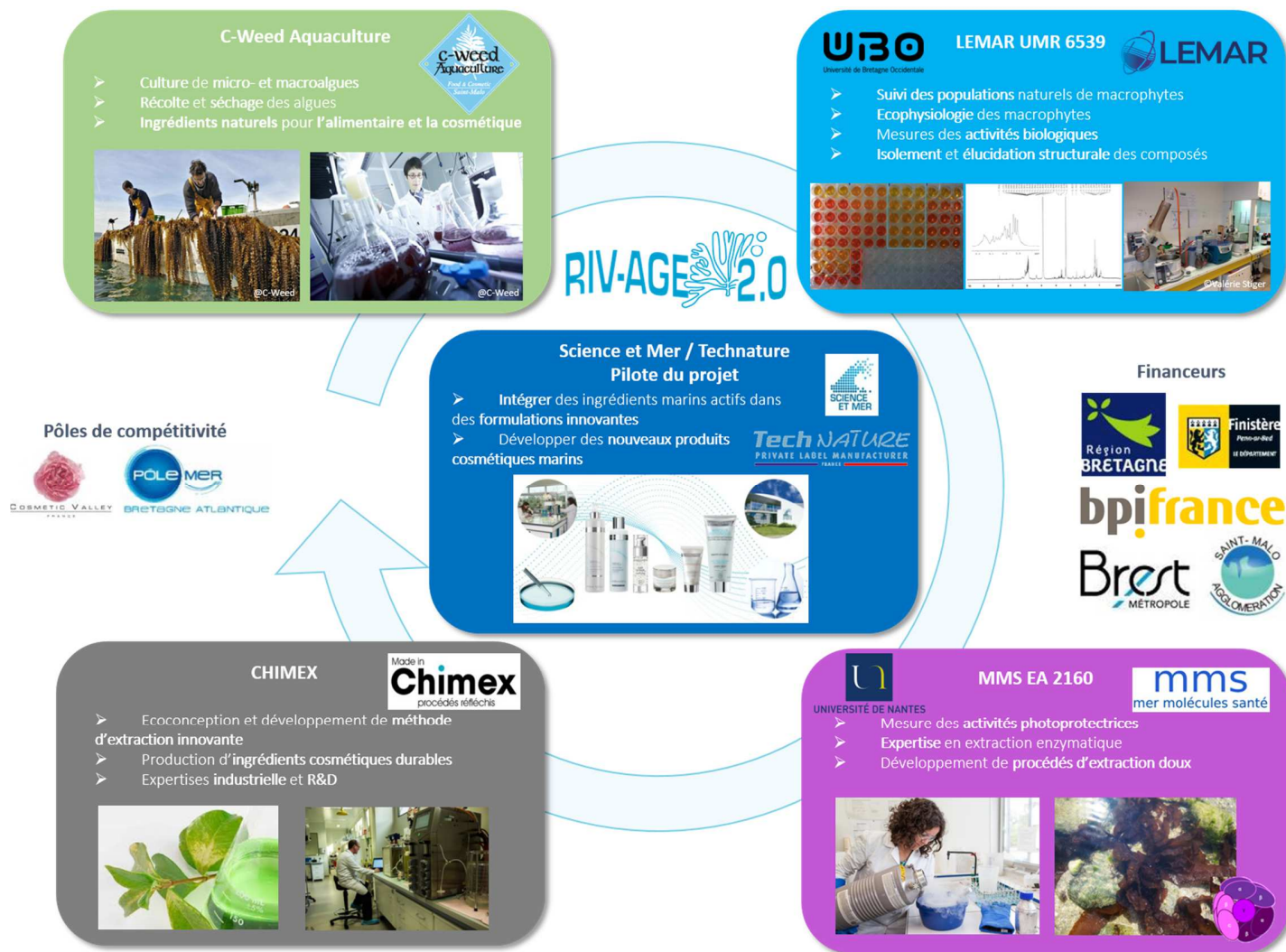


Figure B: Représentation des différents partenaires du projet RIV-AGE 2.0 et leurs compétences pour ce projet.

- SIMER, Technature

- Science & Mer

L'entreprise Science & Mer (SIMER) est une PME créée en 1986 par Dr. Christine Bodeau, et spécialisée dans la conception et la fabrication de produits cosmétiques marins pour la Thalassothérapie, les soins professionnels et des marques de beauté. Le site est situé au Relecq-Kerhuon. De nombreuses collaborations de recherche se sont mises en place entre SIMER et le Laboratoire d'Ecophysiologie et Biotechnologies des Halophytes et Algues Marines (LEBHAM) dont les membres phycologues ont rejoint le Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR) depuis 2012. Un laboratoire commun, Molécule Bleue, fut d'ailleurs créé sur le site de l'IUEM.

- Technature

Technature, façonnier cosmétique créé en 1996 par Pierre Morvan, est spécialisée dans la création de produits cosmétiques sur-mesures proposés aux grandes marques de beauté, aux centres esthétiques ou encore à la vente au détail (<https://www.tech-nature.com/>). En 2017, Technature a racheté Science & Mer, possédant ainsi deux sites de production, un au Relecq-Kerhuon et un autre à Dirinon. Au sein du projet RIV-AGE 2.0, Technature a été pilote de projet et apporté ses compétences dans le développement de formulations cosmétiques innovants en incluant les ingrédients marins actifs obtenus par les autres partenaires.

- Chimex

Chimex, filiale du grand groupe L'Oréal créée en 1938, possède deux activités principales : la recherche et le développement de procédés éco-responsables dans les domaines de la chimie et de la biotechnologie ainsi que la fabrication d'ingrédients cosmétiques (<http://www.madeinchimex.com/fr>). Le siège est situé à Le Thillay en région parisienne, et deux autres sites sont présents à Tours (biotechnologie) et à Mourenx (chimie fine). L'entreprise est affiliée à L'Oréal mais Chimex développe son propre business externe en intégrant une activité de production d'actifs en sous-traitance et le développement de son propre catalogue d'actifs. Au sein du projet RIV-AGE 2.0, CHIMEX a apporté ses compétences dans l'extraction éco-responsable à l'échelle industrielle.

- C-Weed Aquaculture

C-Weed Aquaculture est une entreprise créée en 2000 par Magali Molla et Jean-François Arbona. La société est située à Saint-Méloir-des-Ondes à côté de Saint-Malo (<https://www.c-weed-aquaculture.com/>). Elle est spécialisée dans la mise au point de procédés de culture à terre et en mer ainsi que la production de biomasse par algoculture, et récolte de macroalgues sauvages (par le biais d'un réseau de récoltants). Au

sein du projet RIV-AGE 2.0, C-Weed Aquaculture a fourni la biomasse algale et apporté ses compétences sur les cultures de macroalgues.

- [LEMAR UMR 6539 CNRS UBO IRD IFREMER-IUEM-UBO](#)

Le Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR) situé à Plouzané, fait parti de la composante Mer de l'Université de Bretagne Occidentale, l'Institut Universitaire Européen de la Mer (<https://www-iuem.univ-brest.fr/lemar/>). Le laboratoire est spécialisé dans l'étude du milieu marin au point de vue écologique, biologique, chimique, biogéochimique, physique et législatif. Parmi les nombreux organismes étudiés au sein du LEMAR, les macroalgues font partie depuis 2012 des thématiques phares du laboratoire. Au sein du projet RIV-AGE 2.0, le LEMAR a contribué au montage du projet et a apporté ses compétences dans le choix des algues à étudier et des procédés éco-responsables à utiliser, l'étude des polyphénols d'algues, l'isolement des actifs marins et des tests d'activités biologiques. Ma thèse s'est ainsi inscrite dans ce projet RIV-AGE 2.0 au sein du LEMAR.

- [MMS EA2160-UN](#)

Le laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS) de l'Université de Nantes intervient également dans le projet RIV-AGE 2.0 en apportant ses compétences en hydrolyse enzymatique menée sur la matière algale afin d'améliorer l'extraction de métabolites d'intérêt et en testant les activités photoprotectrices d'extraits naturels ou de crèmes cosmétiques (<https://mms.univ-nantes.fr/>).

Contexte, objectifs de cette étude et plan du manuscrit

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été de travailler sur toute la chaîne de production d'un actif marin pour la cosmétique ([Figure C](#)) : participer à la valorisation de la biomasse algale bretonne, mettre en œuvre des méthodes d'extraction éco-responsables et des méthodes d'identification des composés naturels extraits, ainsi que d'inclure ces composés dans des formulations cosmétiques. Ce travail de recherche, réalisé au sein du LEMAR de l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM, Plouzané, France) s'inscrit dans deux thématiques de l'équipe PANORAMA : l'écologie chimique et surtout les biotechnologies marines.

Dans **un premier Chapitre**, après avoir donné quelques définitions sur la systématique, l'accessibilité à la ressource ou encore le mode de reproduction chez les algues brunes, les facteurs environnementaux influençant la production de métabolites particuliers ont été brièvement développés ainsi qu'un focus important sur les composés phénoliques chez les algues marines. Les valorisations des algues brunes dans les différents domaines industriels et les molécules valorisées ont été développées. Enfin, les modèles d'algues brunes étudiées sont décrits plus en détails ainsi que le protocole de séchage et un bilan des

ressources bibliographiques disponibles sur les teneurs et le type de composés phénoliques chez ces macroalgues.

Dans le **Chapitre 2**, après une description des différentes méthodes utilisées d'extraction et de purification des composés phénoliques classiques et alternatives, sont présentés les résultats sur la recherche de paramètres améliorant l'extraction des composés phénoliques par extraction accélérée par solvant, la mise en place d'un protocole de purification par Flash-Chromatographie ainsi que des essais préliminaires par une méthode de purification appelée chromatographie de partage centrifuge. Les différentes méthodes d'extraction et de purification classiques ont ensuite été comparées aux méthodes alternatives. Enfin, la mise en place d'une méthode de séparation des composés phénoliques par HPLC a été effectuée et les premiers résultats obtenus par spectrométrie de masse, le MALDI-TOF/TOF, utilisé comme méthode d'identification des composés phénoliques sont présentés.

Le **Chapitre 3** de ce manuscrit est consacré à l'étude de la biomasse algale bretonne sous leur aspect stades précoces ou sous forme macroscopique. Dans un premier temps, la recherche de composés phénoliques a été menée sur des stades précoces de 3 algues brunes par différentes méthodes de fragmentation et d'extraction. Une orientation métabolique a également été menée pour tenter d'augmenter la teneur en composés phénoliques. Dans un deuxième temps, l'étude de la variabilité des composés phénoliques chez sept macroalgues brunes à l'état sauvage a été effectuée.

Dans **un dernier chapitre**, la mise en place de deux tests d'activités enzymatiques pour évaluer l'activité anti-âge des extraits/fractions d'algues a été effectuée. Ensuite, l'étude de la stabilité des composés phénoliques d'une algue brune, *Halidrys siliquosa*, a été réalisée sur des extraits secs dans différentes conditions de lumière et de température puis inclus dans une crème cosmétique dans des conditions différentes de stockage. La stabilité a été suivie deux méthodes différentes et complémentaires : la Résonance Magnétique Nucléaire du proton et le test du Folin-Ciocalteu.

Enfin, ce manuscrit se termine par une **synthèse des principaux résultats** obtenus et les **perspectives** qu'offre ce travail.

De la biomasse à la formulation cosmétique

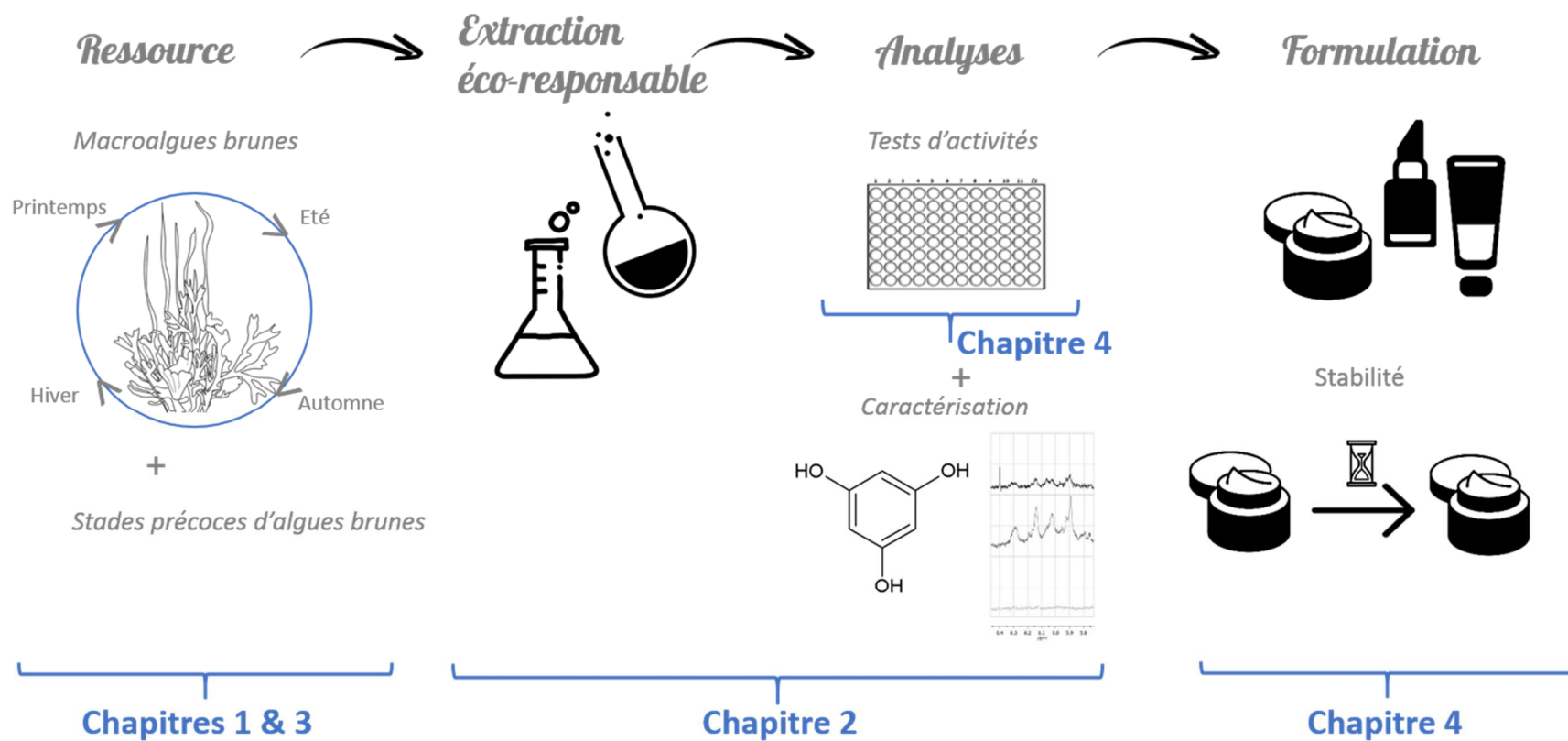
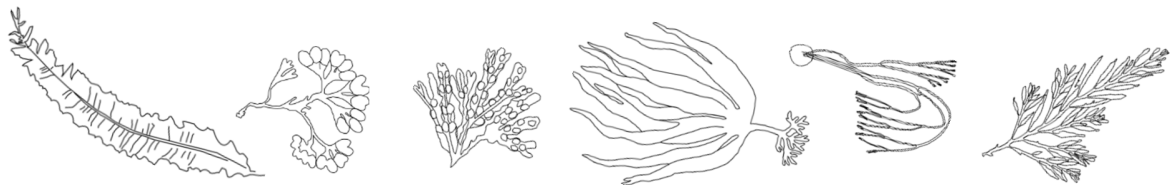


Figure C: Les différentes étapes de la biomasse jusqu'à la formulation cosmétique.



Chapitre 1 : Les algues, une ressource d'intérêt industriel et modèles étudiés



1 La ressource algale : focus sur les algues brunes

1.1 Les algues

Les algues, incluant les micro- et macroalgues, constituent un ensemble d'organismes photosynthétiques extrêmement divers et se répartissent selon différentes voies évolutives indépendantes les unes des autres (De Reviere, 2002 ; Adl et al., 2012 ; Boudouresque, 2014 ; Burki et al., 2016). Il peut s'agir de bactéries (Cyanobacteria), d'organismes eucaryotes proches des plantes terrestres (Chlorophyta) ou sans lien de parenté direct avec celles-ci

(Ochrophyta) (Figure 1-1). Ce sont des organismes photosynthétiques possédant tous de la chlorophylle *a* ainsi que d'autres pigments surnuméraires pour réaliser la photosynthèse, et qui ont besoin d'eau de manière temporaire ou permanente. Elles peuvent vivre aussi bien en eau douce qu'en eau salée comme l'eau de mer. Les végétaux du milieu marin correspondent pour la plus grande part aux algues, présentes dans toutes les mers du monde. Le nombre total d'espèces d'algues était estimé à plus de 70000 selon l'inventaire de Guiry en 2012 répertorié dans la base de données AlgaeBase (<http://www.algaebase.org/>). A l'heure d'aujourd'hui, AlgaeBase donne une estimation de plus de 50000 espèces.

Les macroalgues, ou grandes algues, englobent les organismes aquatiques photosynthétiques pluricellulaires, le plus souvent visibles à l'œil nu (Kornprobst, 2005). Ces macroalgues sont pour la plupart du temps séparées en 4 grands

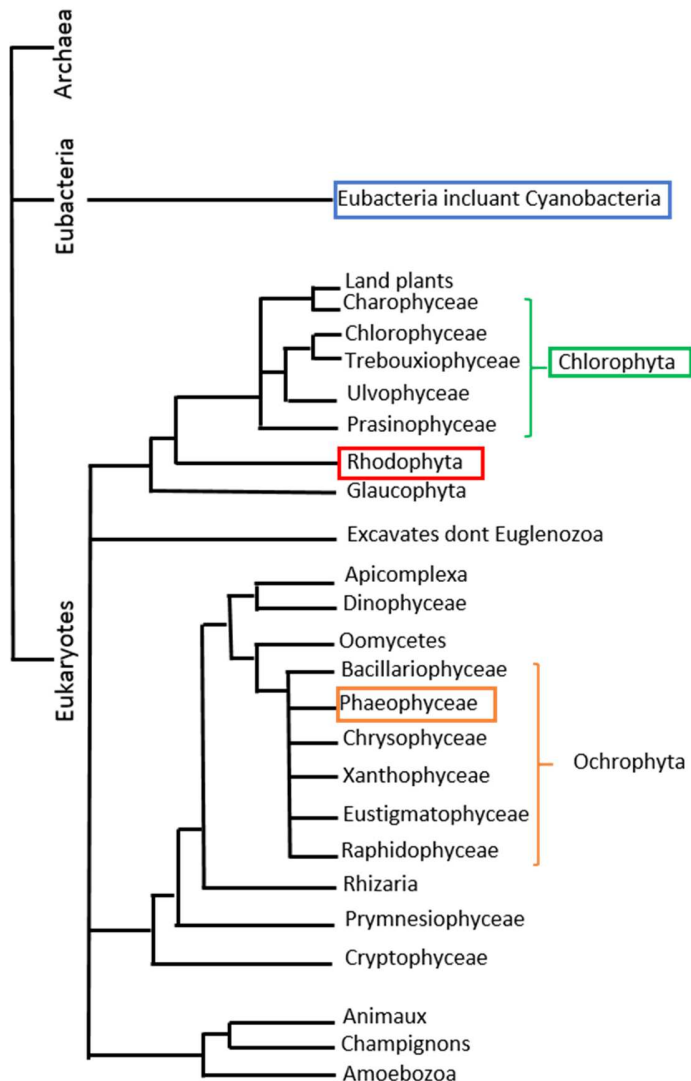


Figure 1-1 : Relations phylogénétiques entre les 3 grandes lignées, Archées, Eubactéries et Eucaryotes avec les 4 grands groupes de macroalgues encadrés : les Phaeophyceae ou algues brunes, les Chlorophytes ou algues vertes, les Rhodophyta ou algues rouges et les Cyanobacteria ou algues bleues.

groupes provenant de lignées évolutives différentes : les Cyanobactéries ou algues bleues, les Chlorophytes ou algues vertes, les Rhodophyta ou algues rouges et les Phaeophyceae ou algues brunes (Figure 1-1). Ce sont ces dernières qui vont nous intéresser dans cette étude.

1.2 Les macroalgues brunes ou Phaeophyceae

1.2.1 Définitions

Les algues brunes ou Phaeophyceae sont une classe d'algues de l'embranchement des Ochrophyta (Figure 1-1) (Cock & Coelho, 2011). Ce sont des organismes purement marins à quelques exceptions près, et très largement distribués à la surface de la Terre. En effet, ce sont les algues qui représentent la biomasse la plus abondante des mers tempérées et froides, il existe approximativement 2000 espèces dans le monde (Bunker et al., 2017). Elles tirent leur couleur caractéristique, mais non spécifique, de la présence dans les chloroplastes de pigments de couleur jaune-orangé, les xanthophylles (dont la fucoxanthine) et les carotènes (dont le β -carotène) en plus des pigments verts, les chlorophylles *a* et *c* (De Reviere, 2002). En plus des pigments, les Phaeophyceae se définissent par d'autres critères biochimiques communs comme l'absence d'amidon intraplastidial mais des réserves cytoplasmiques et vacuolaires de natures diverses comme la laminarine (De Reviere, 2002). Le mannitol est également un polyol de réserve présent chez toutes les algues brunes (De Reviere, 2003). Ce dernier est considéré comme le métabolite régulant la pression osmotique des cellules des algues brunes (De Reviere, 2003). Par ailleurs, la paroi des algues brunes contient une partie rigide cellulosique et une partie mucilagineuse composée d'alginate et de polymères complexes à base de fucose comme les fucanes (De Reviere, 2002). Ils permettent à l'algue d'être résistante et flexible face à l'action des vagues notamment (Gupta & Abu-Ghannam, 2011a). L'alginate est le polysaccharide matriciel principal des parois cellulaires des algues brunes (Andrade et al., 2004 ; Leal et al., 2008). Dans le cytoplasme, des structures sphériques spécialisées sont retrouvées, ce sont les physodes contenant des composés phénoliques (De Reviere, 2002). Ces algues brunes sont également caractérisées par des critères cytologiques communs mais non spécifiques comme la structure des plastes, la disposition des thylacoïdes, la forme des crêtes mitochondriales ainsi que l'appareil flagellaire : le nombre total de membranes ceinturant les plastes est de 4 (témoin de l'endosymbiose secondaire entre un protiste ancestral et une algue rouge unicellulaire), les thylacoïdes sont groupés par 3 en lamelle avec la dernière lamelle faisant le tour du plaste, les crêtes mitochondriales sont de forme tubulaire et les spores ou gamètes ont une structure hétérocontée présentant deux flagelles différents (De Reviere, 2002). Enfin, ces algues possèdent des organes reproducteurs particuliers uni- et pluriloculaires et ce sont les seules parmi les Ochrophytes à posséder des plasmodemes, un tunnel à travers la paroi cellulosique des cellules et constituant les voies de passage de l'eau, des solutés et autres molécules (De Reviere, 2002).

1.2.2 Répartition des macroalgues brunes bretonnes sur l'estran

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux macroalgues brunes de Bretagne (France). Sur ces côtes bretonnes, les grandes algues brunes constituent de larges ceintures limitées par de nombreux facteurs comme par exemple la disponibilité en lumière, les conditions d'exondation/dessiccation pour les algues en haut de l'estran ou la compétition entre les algues et le broutage pour les algues du bas de l'estran. L'estran est séparé, dans sa hauteur, par les différents niveaux de marée avec des espèces caractéristiques à chaque niveau (Figure 1-2). Classiquement, l'étage médiolittoral ou zone intertidale correspond à la zone de balancement des marées, situé en-dessous de l'étage supralittoral et au-dessus de l'étage infralittoral. Les principales algues brunes bretonnes sont représentées sur l'estran sur la Figure 1-2 en milieu battu (gauche) et en milieu abrité (droite).

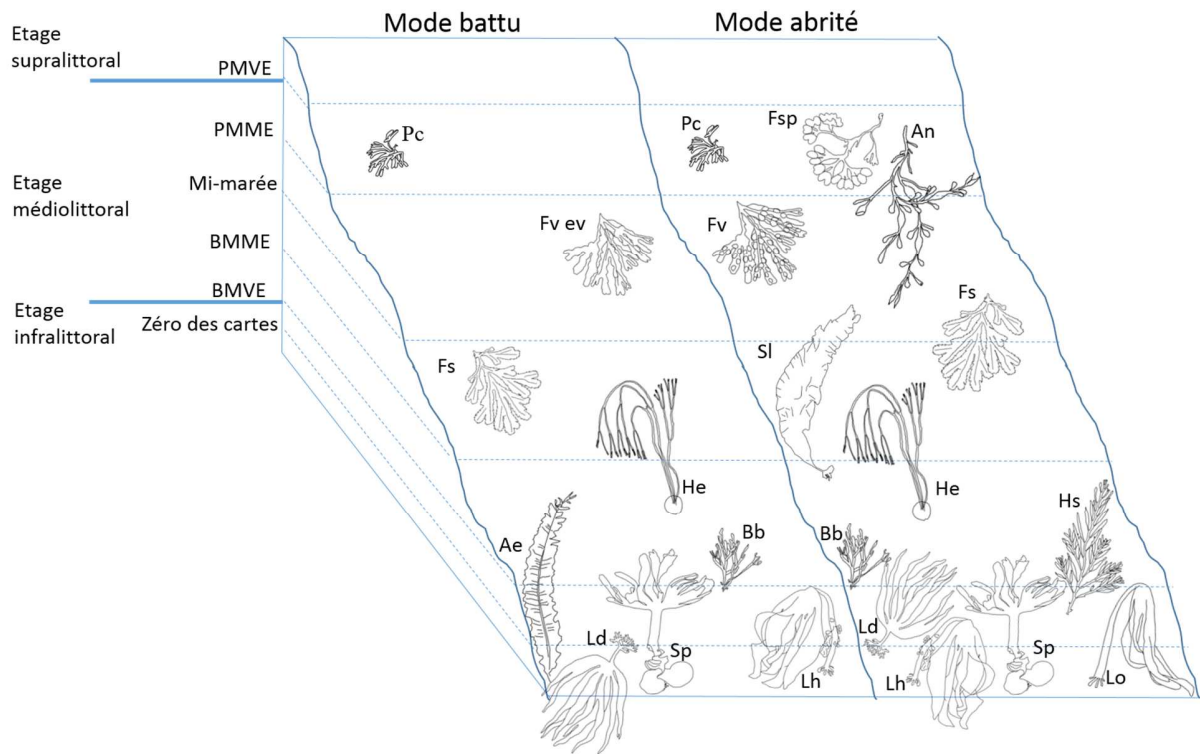


Figure 1-2 : Répartition des principales macroalgues brunes sur l'estran breton en mode battu (sur la gauche) et en mode abrité (sur la droite). PMVE : pleine mer de vive-eau ; PMME : pleine mer de morte-eau ; BMME : basse mer de morte-eau ; BMVE : basse mer de vive-eau ; Zéro des cartes : niveau des plus basses mers ; Ae : *Alaria esculenta* ; An : *Ascophyllum nodosum* ; Bb : *Bifurcaria bifurcata* ; Fs : *Fucus serratus* ; Fsp : *Fucus spiralis* ; Fv : *Fucus vesiculosus* ; Fv ev : *Fucus vesiculosus evesculosus* ; Hs : *Halidrys siliquosa* ; He : *Himanthalia elongata* ; Ld : *Laminaria digitata* ; Lh : *Laminaria hyperborea* ; Lo : *Laminaria ochroleuca* ; Pc : *Pelvetia canaliculata* ; Sl : *Saccharina latissima* ; Sp : *Saccorhiza polyschides* (D'après Floc'h, 1964).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à trois espèces d'algues présentes sur l'étage médiolittoral : *Ascophyllum nodosum* (An), *Fucus serratus* (Fs) et *Himanthalia elongata* (He). Trois autres espèces ont été étudiées mais cette fois-ci présentes à l'étage infralittoral : *Alaria esculenta* (Ae),

Laminaria ochroleuca (Lo) et *Halidrys siliquosa* (Hs). Une autre espèce a été étudiée, présente à la limite entre le bas de l'étage médiolittoral et le haut de l'étage infralittoral, mais aussi dans les flaques de l'estran, c'est *Bifurcaria bifurcata* (Bb). Enfin, deux macroalgues brunes non représentées sur la [Figure 1-2](#) ont été étudiées : *Undaria pinnatifida* (Up) plutôt présente dans les ports ou cultivée et *Ectocarpus siliculosus* (Es), épiphyte de nombreuses autres algues sur les différentes étages.

1.2.3 Cycle de vie des macroalgues brunes

Les cycles de reproduction (ou cycle de vie ou de développement) chez les Eucaryotes impliquent une alternance entre les générations diploïdes et haploïdes, la méiose assurant la transition de l'état diploïde à l'état haploïde et la fécondation assurant la fusion des gamètes et donc l'apparition d'une phase chromosomique diploïde. Les algues brunes présentent une grande variété de cycles de développement ([Heesch et al., 2019](#)). Les cycles de vie les plus complexes se traduisent par l'alternance de générations c'est à-dire qu'il y a une succession de phases haploïdes (n) et de phases diploïdes (2n). Trois exemples correspondant aux classes d'algues étudiées dans ce travail sont présentés ci-dessous.

- Exemple de *Fucus* sp. : cycle monogénétique diplophasique (réduction de la phase haploïde aux gamètes)

Le cycle monogénétique diplophasique est illustré avec l'exemple de *Fucus serratus* ([Figure 1-3](#)). Ce cycle implique un individu diploïde (2n) appelé méïosporophyte, correspondant au thalle observé sur l'estran. Lorsque ce dernier entre en période de reproduction, à maturité, il produit des réceptacles diploïdes (localisés à l'extrémité des rameaux et visibles à l'œil nu) présentant à l'intérieur des cryptes pilifères appelées conceptacles ([Figure 1-3](#)). Le conceptacle est une cavité où sont produits les gamètes dans des saccules diploïdes. Suite à la méiose, les saccules mâles, appelés anthérocytes, produisent les gamètes mâles haploïdes appelés anthérozoïdes. Quant à la partie femelle, les saccules femelles appelés oogones produisent et libèrent des gamètes haploïdes appelés oosphères. Les espèces peuvent être monoïque (un seul type d'individu produisant les deux types de gamètes et alors un seul type d'individu est présent dans la population, comme *Pelvetia canaliculata*) ou dioïque (un individu produit un seul type de gamètes et alors deux individus, un mâle et un femelle, sont présents dans la population, comme *Fucus serratus*). Après libération et rencontre des gamètes, suite à la fécondation, il y a formation d'un zygote diploïde (2n) qui, suite à plusieurs mitoses consécutives, formera un nouveau méïosporophyte.

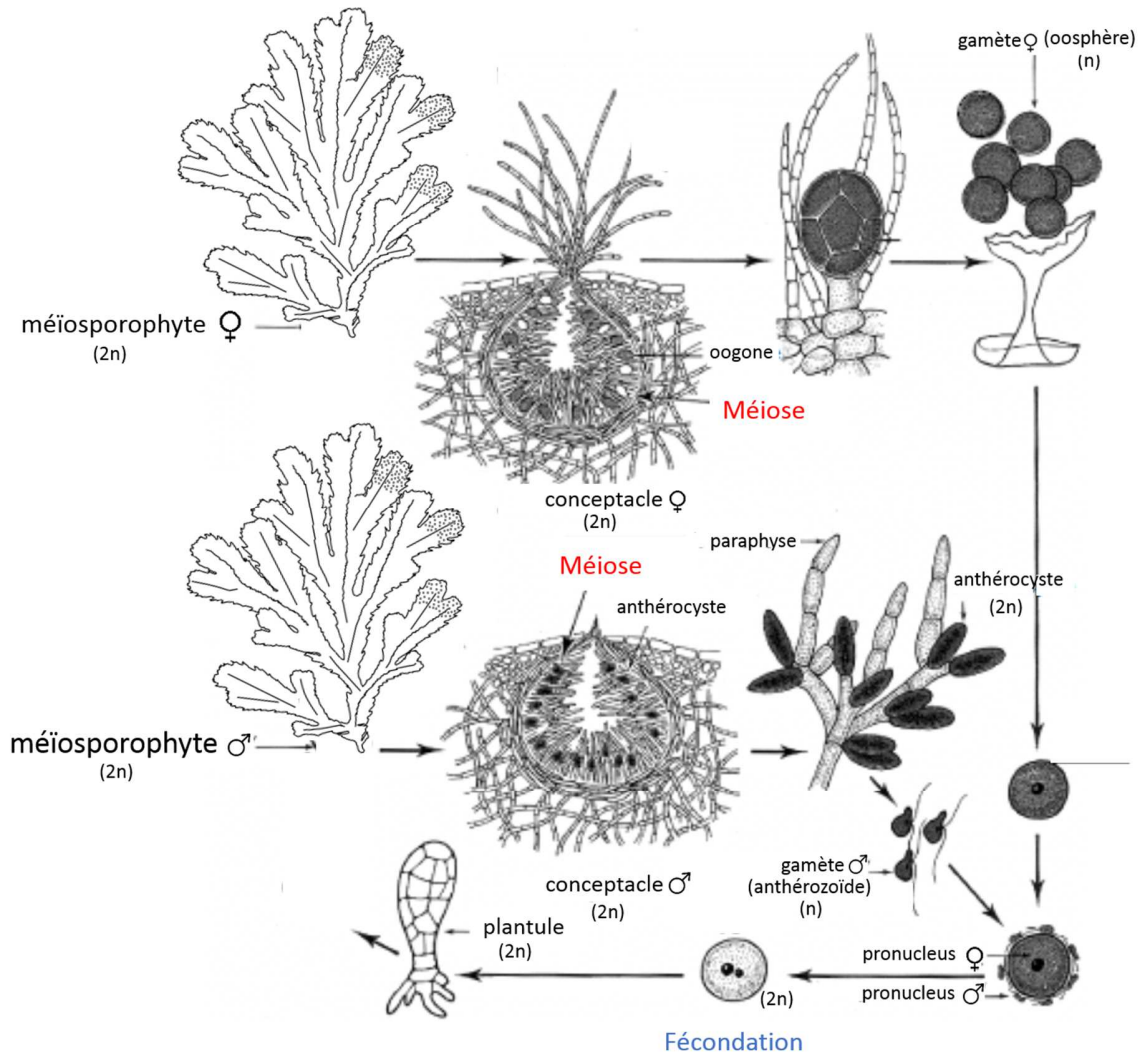


Figure 1-3 : Cycle de reproduction de *Fucus serratus* modifié de Gayral (1966).

- Exemple des Laminaires : cycle digénétique haplodiplophasique

Le cycle comporte un individu diploïde (2n) appelé sporophyte, ici macroscopique puisque pouvant atteindre une taille de 1,5 à 4 mètres. Il correspond au thalle retrouvé sur l'estran fixé par un crampon au substrat rocheux. A maturité, certaines cellules à la surface de la lame se modifient en sporocystes. Ces cellules vont produire des zoospores haploïdes par méiose (Figure 1-4). Après leur émission dans la colonne d'eau, leur dispersion, ces spores vont perdre leurs flagelles et se fixer au substrat. Elles vont germer et donner des gamétophytes haploïdes mâles ou femelles. Les gamétophytes, de tailles

microscopiques, vont libérer à maturité des gamètes mâles appelés anthérozoïdes et les gamétophytes femelles des gamètes femelles appelés oosphères.

La formation d'un zygote ($2n$) se réalise lorsqu'il y a fécondation entre l'oosphère qui reste sur le gamétophyte femelle, par l'anthérozoïde. Ce zygote donnera, après de multiples mitoses successives, un nouveau sporophyte. Les deux générations, sporophyte et gamétophyte, ont des morphologies différentes, elles sont dites hétéromorphes.

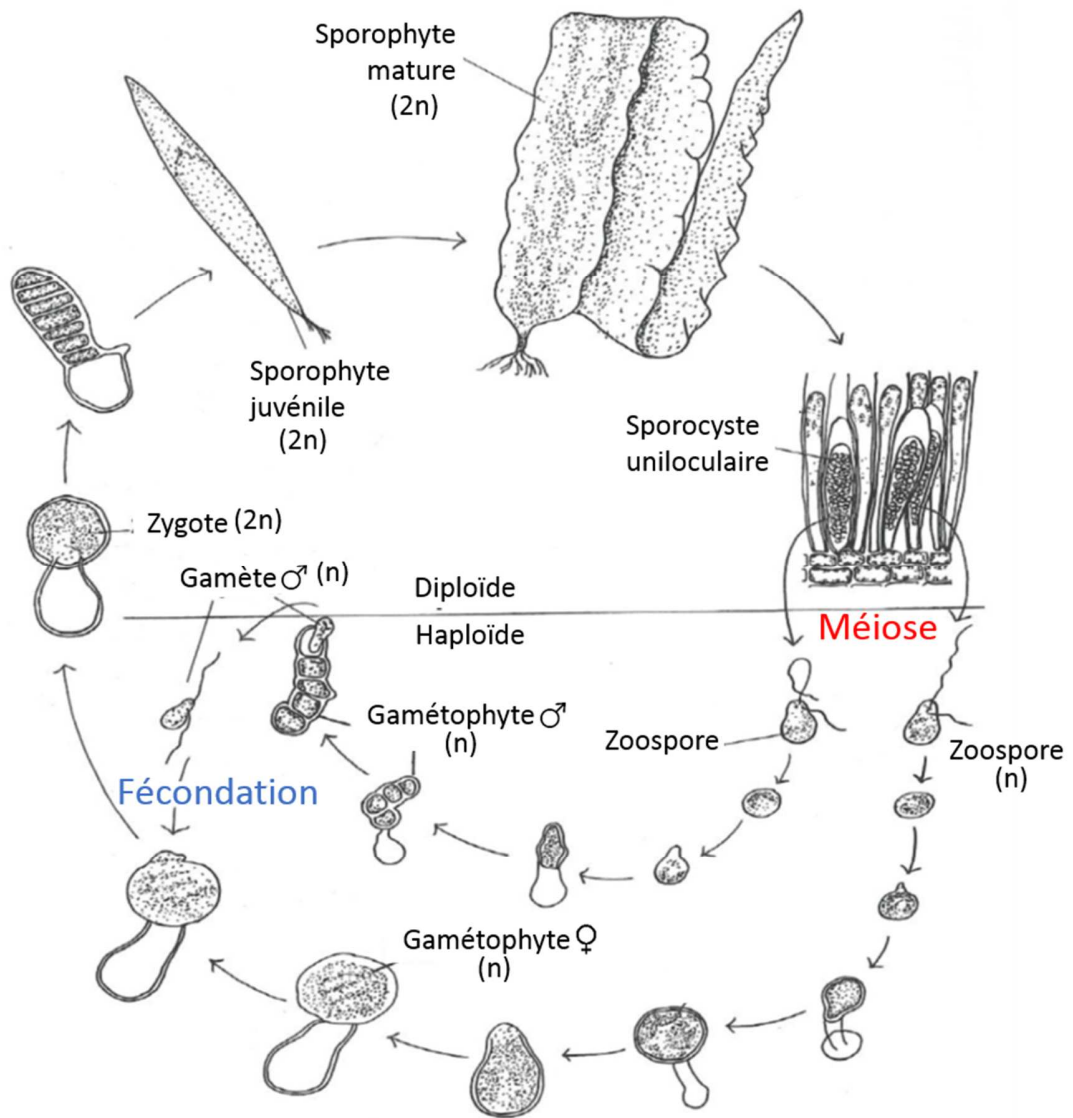


Figure 1-4 : Cycle de reproduction de *Saccharina japonica*, modifié de Lee (1999).

- Exemple des Ectocarpales

Le cycle de reproduction d'*Ectocarpus siliculosus* est représentatif de la famille des Ectocarpaceae. Une reproduction asexuée ou sexuée est possible (Figure 1-5). Les phases haploïdes et diploïdes sont toutes les deux filamenteuses, cependant les filaments diploïdes possèdent des cellules plus allongées que les filaments haploïdes (Lee, 1999). Les sporophytes ($2n$) et les gamétophytes (n) d'*Ectocarpus* sont qualifiés d'isomorphes. La reproduction se réalise à l'aide de zoospores biflagellés. Ces dernières sont produites par des sporocystes présents sur le sporophyte: les sporocystes sont soit uniloculaires, soit pluriloculaires soit sur un même individu, soit séparés sur des individus différents. Comme pour les sporocystes uniloculaires, les sporocystes pluriloculaires se développent à partir de cellules terminales des ramifications du sporophyte diploïde. Les sporocystes uniloculaires libèrent des zoospores haploïdes tandis que les sporocystes pluriloculaires produisent des zoospores diploïdes. La cellule mère d'un sporocyste uniloculaire se distingue d'une autre cellule par sa forme sphérique et son noyau volumineux. Les zoospores haploïdes libérées s'attachent au substrat, germent et forment un nouvel individu dont la structure est proche du sporophyte mais correspond aux gamétophytes.

Dans les sporocystes pluriloculaires, les cellules se divisent et se disposent en rangées régulières. Les zoospores, cette fois-ci diploïdes, sont libérées du sporocyste puis germent en thalle diploïde. Concernant les gamètes, ils sont produits dans des gamétocystes pluriloculaires portés par les gamétophytes. Les gamétocystes pluriloculaires et les sporocystes pluriloculaires ont une structure et un développement similaires. Chez *E. siliculosus*, les gamètes sont morphologiquement similaires (isogamie) mais la fécondation se produit entre des gamètes libérés de thalles différents (dioécie). Après fécondation, un zygote diploïde se forme pour donner un nouveau sporophyte.

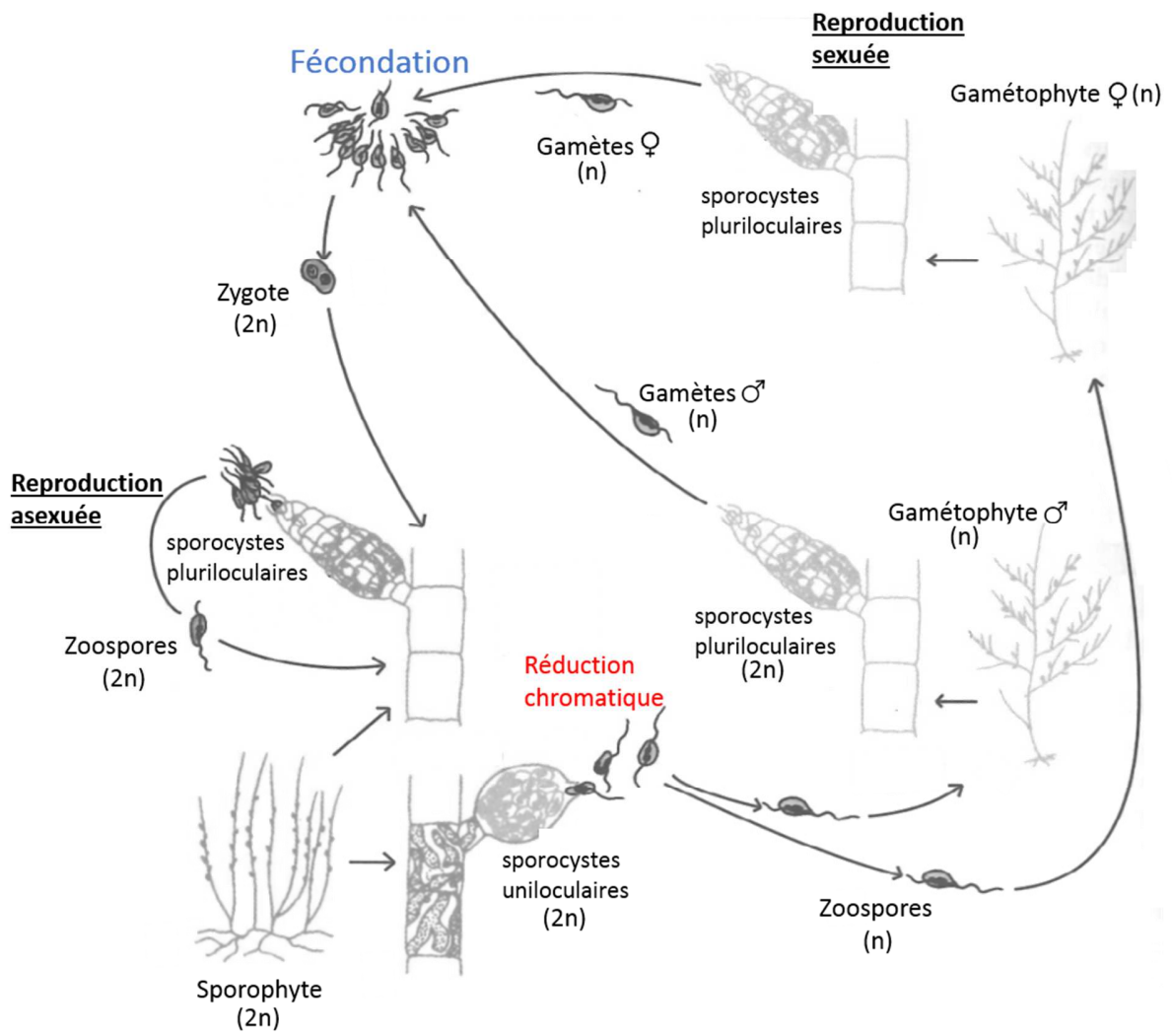


Figure 1-5 : Cycle de reproduction d'*Ectocarpus siliculosus*, modifié de De Reviere (2002).

2 Les métabolites algaux et leur variabilité : focus sur les composés phénoliques

La plupart des macroalgues marines vivent attachées à un substrat sur les zones côtières, caractérisées par un environnement très variable principalement en raison du cycle des marées plus ou moins important selon les situations géographiques. Les macroalgues vont se répartir sur l'estran en fonction de leur résistance à plusieurs facteurs biotiques et abiotiques. Certaines espèces sont donc présentes dans la zone intertidale et restent plus ou moins longtemps hors de l'eau chaque jour. A l'inverse, d'autres sont toujours sous l'eau lorsqu'elles vivent dans la zone subtidale ou dans des mares où les paramètres abiotiques peuvent être fortement modifiés pendant un cycle de marée. Au cours de ces périodes d'immersion/émersion, les macroalgues sont impactées par d'importantes modifications de nombreux paramètres abiotiques et biotiques. Pour contrer ces variations importantes, les macroalgues possèdent des systèmes de défense en produisant des molécules spécifiques. Les facteurs biotiques et abiotiques ainsi que les molécules de protection produites chez les algues sont présentés en [Annexe I](#) et font l'objet d'un manuscrit publié dans le journal *Advances in Botanical Research*. Les composés phénoliques font partie de ces molécules produites pour se protéger de nombreux stress environnementaux. Les principaux facteurs biotiques influençant une production de ces composés sont le broutage ([Pavia & Brock, 2000](#) ; [Svensson et al., 2007](#)), l'épiphytisme par d'autres algues ([Jennings & Steinberg, 1997](#)), la croissance ou encore la reproduction ([Stiger et al., 2004](#) ; [Plouguerné et al. 2006](#)). Concernant les facteurs abiotiques, l'irradiance ou les radiations UV ([Pavia & Brock, 2000](#) ; [Swanson & Druehl, 2002](#)), l'hydrodynamisme ([Plouguerné et al., 2006](#) ; [Le Lann et al., 2012a](#)), la profondeur, les nutriments ([Le Lann et al., 2012a](#)), la latitude ([Targett et al., 1992](#) ; [Tanniou et al., 2014](#)) ou encore les saisons ([Connan et al., 2004](#) ; [Kamiya et al., 2010](#)) ont montré une influence sur les teneurs en ces métabolites particuliers.

Ces composés phénoliques, dont les structures varient selon les algues, leur permettent de résister à différents stress par leurs nombreuses propriétés telles que antioxydantes, antimicrobiennes, photoprotectrices ou anti-broutage. De part ces propriétés, ces molécules possèdent des activités intéressantes à valoriser dans de nombreux domaines industriels comme la santé (anti-cancer, antidiabétique par exemple) ou la cosmétique (anti-âge par exemple). Les différents types de composés phénoliques retrouvés chez les algues marines ainsi que leurs nombreuses propriétés biologiques et leur potentiel de valorisation dans l'industrie médicale et cosmétique sont ainsi présentés dans cette section et font l'objet d'un Chapitre dans un ouvrage Wiley intitulé *Recent Advancements in Micro and Macroalgal Processing : Food and Health Perspectives*, en cours de publication (cf ci-après).

Marine algal-derived phenolic compounds and their biological activities for medicinal and cosmetic application

Leslie Gager*✉, Fanny Lalegerie*, Solène Connan, Valérie Stiger-Pouvreau

Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, F-29280 Plouzane, France

*Leslie Gager and Fanny Lalegerie contributed equally to this work

Abstract

Marine algae, representing a polyphyletic group, are considered as a rich food source as these organisms produce a great variety of molecules including proteins, polysaccharides, dietary fiber, amino acids, minerals, vitamins, and aromatic compounds. Among them, phenolic compounds are metabolites present in various organisms, including marine algae, and are known to be synthesized in response to different environmental conditions. In particular, they protect these organisms against herbivores or epiphytes, bacterial infection or UV radiation. Once consumed, they may be beneficial to human health and chronic disease risk prevention since they have a wide range of bioactivities. They can exhibit antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antitumor, anti-ageing, pro-mineralogenic activities or act as modulators of cardiovascular disease risk. This review presents phenolic compounds encountered in marine algae, i.e. micro- and macroalgae, their chemical structures together with their biological activities and their potential valorization for medical and cosmetic industries.

Keywords

Marine macro- and micro-algae, polyphenols, bioactivities, antioxidant, anti-inflammatory, anti-microbial, cancer prevention, cardiovascular diseases, cosmetic

Introduction

The search for natural food ingredients to replace synthetic and controversial molecules, such as the synthetic antioxidants and colorants which could be toxic for the environment and human health, is growing (Carocho, Barreiro, Morales and Ferreira 2014). Terrestrial resources are widely explored but marine resources, such as algae, are not yet fully valorized. Algae are photosynthetic organisms belonging to a polyphyletic group including microscopic and large algae, i.e. microalgae and seaweeds respectively. Moreover, the term "algae" refers to organisms that perform photosynthesis through the chlorophyll *a* pigment, have a simple vegetative form called a thallus and need water for their life cycle to be complete (Lee 1999). In this way, algae involve a majority of eukaryotic but also prokaryotic organisms. Macroalgae can be classified into three different groups: brown algae (Ochrophyta which include the Phaeophyceae class), red algae (Rhodophyta) and green algae

(Chlorophyta). Cyanobacteria are also referred to as algae; it is the only prokaryotic group, at the base of the living organisms, and are known as blue-green algae (Figure 1; Stengel, Connan and Popper 2011). Microalgae, or phytoplankton, are photosynthetic, single-celled organisms or a colony less than 0.2 mm long, living either floating in the ocean or attached to a substrate (Lee 1999). Among microalgae, are found different groups such as the Chlorophyta, the Rhodophyta, the Haptophyta with a flagellum sometimes a haptonema and organic scales, the silicoflagellates with a siliceous endoskeleton, the diatoms

(Bacillariophyta) characterized by a silica cover called a "frustule", and the dinoflagellates with or without an outer cellulosic cover (theca) (Lee 1999).

The distinctions between the taxonomic algal groups involve differences over and above size or pigmentation: algae differ considerably at the structural and biochemical levels (Lee 1999). Adaptive diversification of algae for more than 2.45 billion years to optimize their competitive survival in a variety of ecological niches has led to a co-evolution of a range of different biochemical compounds including secondary metabolites

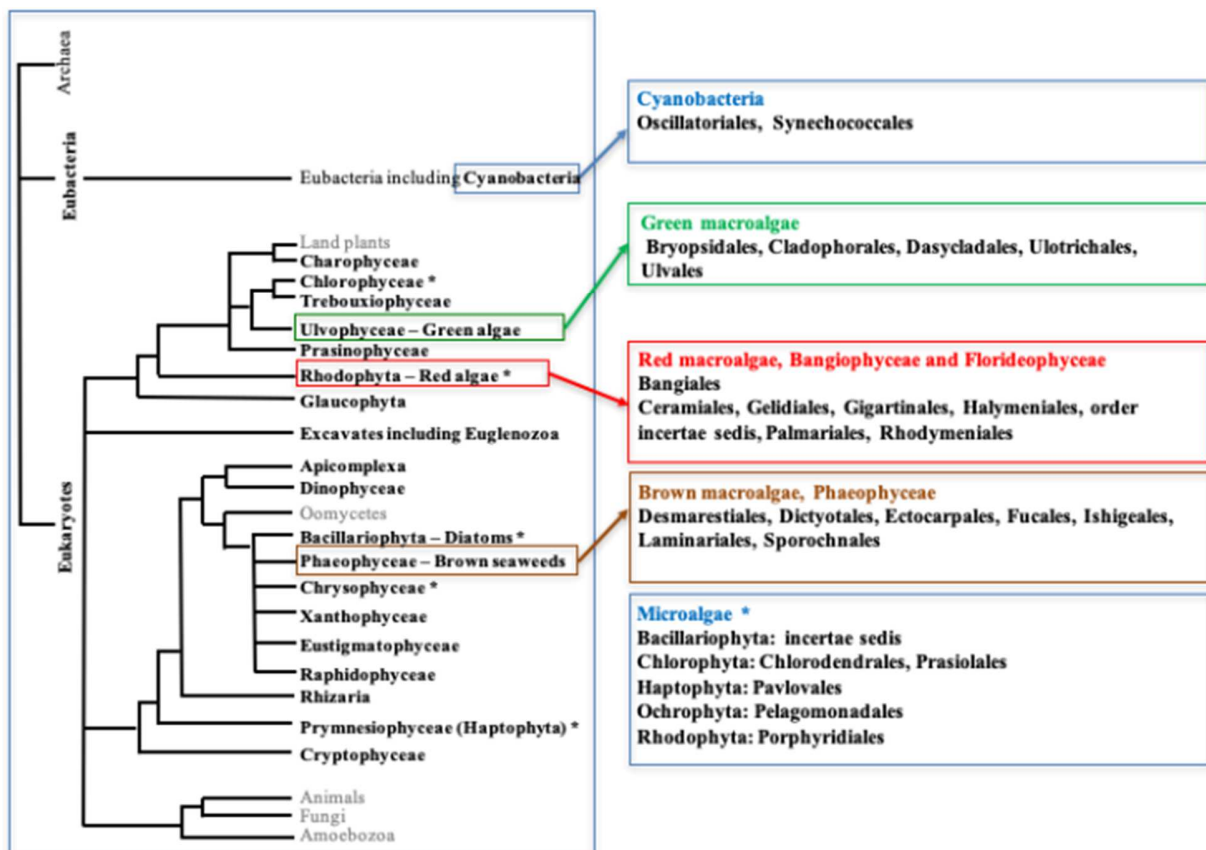


Figure 1: Phylogenetic tree (adapted from Stengel et al. 2011) showing the taxonomical position of each algal group cited in this chapter together with their taxonomical orders. * near microalgae refers to * near classes of microalgae on the phylogenetic tree.

(Baurain et al. 2010; Stengel et al. 2011). Indeed, algae contain a panel of bioactive compounds showing valorization potential in various industries, such as food (i.e. functional foods and nutraceuticals), agriculture, pharmaceutical or cosmetic sectors (Sanjeewa, Kim, Son and Jeon 2016; Wijesinghe and Jeon 2011). Among those algal molecules, phenolic compounds are present in all algal groups. Some phenolics found in terrestrial plants are also found in algae, including caffeic acid and catechin (Onofrejobá et al. 2010; Rodríguez-Bernaldo de Quirós, Lage-Yusty and López-Hernández 2010; Farvin and Jacobsen 2013), or isoforms of tocopherol, commonly referred to as vitamin E (Farvin and Jacobsen 2013). However, the presence of flavonoids such as anthocyanins in algae is still not conclusive (Stengel et al. 2011). Phenolic compounds can be primary metabolites essential for the survival or structural integrity of algae, as for example, phlorotannins found in brown seaweeds, which are an integral part of the cell wall composition (Deniaud-Bouët, Hardouin, Potin, Kloareg and Hervé 2017). These phlorotannins are also secondary metabolites playing a defensive role against environmental stresses such as herbivorous grazing (Geiselman and McConnell 1981), epiphytes settlement (Jennings and Steinberg 1997) or UV-radiation (Swanson and Druehl 2002). Because of the rich and varied compositions of algae (Bourgougnon and Stiger-Pouvreau 2011; Ibañez, Herrero, Mendiola and Castro-Puyana 2012; Abirami, Uthra and Arumugam 2018), there is a growing interest in

algal research as they may have positive effects on human health (Shalaby 2011). For example, the search of natural molecules is increasing to replace synthetic and controversial preservatives (Gupta and Abu-Ghannam 2011b; Chakraborty, Joseph and Praveen 2015) or synthetic antioxidants (Chen, Pearson and Gray 1992). In this sense, algae are excellent candidates to be considered as a functional food (Rodríguez-Bernaldo de Quirós et al. 2010).

This chapter presents the chemical structures of phenolic compounds which are produced by marine cyanobacteria, micro- and macroalgae, as well as their isolation methods and biological activities with a focus on the dietary, medical, well-being and cosmetic sectors. As brown seaweeds are the most studied marine algae, perhaps because they contain high levels of phenolic compounds, we focus mainly on these organisms in this chapter, although other algal groups are also discussed. Finally, we discuss the potential commercial applications to health and dietary sectors of these extraordinary diverse marine compounds.

Types and structures of phenolic compounds from algae

Phenolic compounds are comprised of one or more hydroxyl groups ($-OH$) directly bonded to an aromatic hydrocarbon group (Waterman and Mole 1994), and include a wide range of compounds, from simple molecules such as phenolic acids to more complex polyphenols such as the

phlorotannins encountered in brown seaweeds (Buikema, McGinniss and Cairns 1979; Ragan and Glombitza 1986; Machu et al. 2015; Gómez-Guzmán, Rodríguez-Nogales, Algieri and Gálvez 2018). Phenolic compounds tend to be alcohol- or water-soluble, since they frequently occur as glycosides, and are located in vacuoles. As all phenolic compounds contain at least one aromatic ring, they all show intense absorption in the UV region of the spectrum (Harborne 1984).

Although phenolics are present in all algal groups, the most widely studied phenolic compounds in marine algae are the phlorotannins isolated from marine brown algae class Phaeophyceae (Arnold

and Targett 2002), which can accumulate high levels of phenolic compounds up to nearly 30% of their dry weight (DW) (Ragan and Glombitza 1986; Murray, Dordevic, Ryan and Bonham 2018a). Some phenolic compounds may be halogenated, nitrogenous or sulfated (La Barre, Potin, Leblanc and Delage 2010), conferring different biological activities (Cabrita, Vale and Rauter 2010; La Barre et al. 2010). For example, bromophenols, halogenated monomeric phenolics, are common to all algal groups. Interestingly, they have also been detected in many kinds of seafood (e.g prawns, crustaceans, molluscs; reviewed in Whitfield, Helidoniotis, Shaw and Svoronos 1999) or

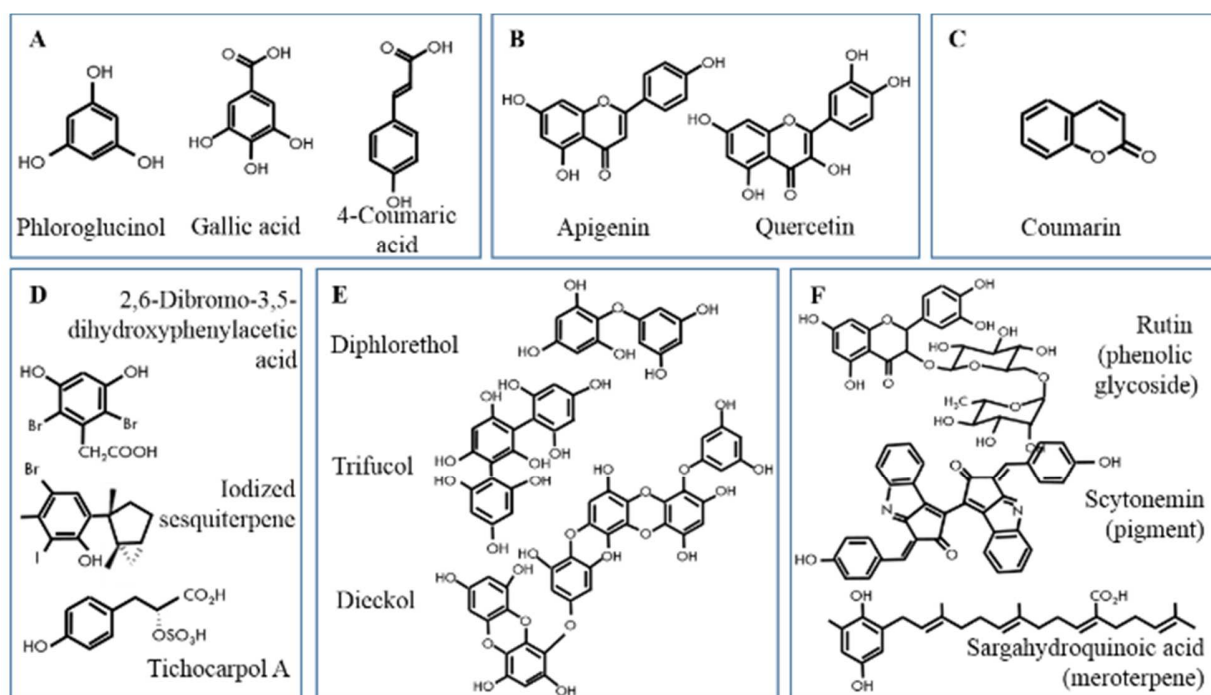


Figure 2: Examples of chemical structures of the different types of phenolic compounds produced by marine algae. A: Phloroglucinol and phenolic acids, B: Flavonoids (flavone and flavonol), C: Coumarin, D: Halogenated and sulfated compounds, E: Phlorotannins (phloretol, trifucol, eckol), F: Complex molecules (phenolic glycoside, pigment, meroterpene) (De Nanteuil and Mastagli 1981; Whitfield et al. 1999; Yoshie-Stark et al. 2003; Goiris et al. 2014; Kornprobst 2014; Kirke et al. 2017).

polychaetes and may contribute to the flavor of marine fish (Whitfield et al. 1999). In this review, we describe phenolic compounds that are produced by each taxonomical group of marine algae. Figure 2 illustrates examples of these compounds that have been isolated from the different algal groups including green, red and brown macroalgae, cyanobacteria and microalgae (De Nanteuil and Mastagli 1981; Whitfield et al. 1999; Yoshie-Stark, Hsied and Suzuki 2003; Goiris et al. 2014; Kornprobst 2014; Kirke, Smyth, Rai, Kenny and Stengel 2017).

Phenolic compounds from marine Cyanobacteria and microalgae

As the phenolic content is very low in microalgae and Cyanobacteria compared to macroalgae (<5 mg Gallic Acid Equivalents g⁻¹ DW in microalgae; Ahmed et al. 2014), these compounds have not been well studied. Many research papers just reported the phenolic content of algal extracts, with only a few devoted to their structural elucidation. Moreover, while a few research papers are focused on marine microalgae and Cyanobacteria (e.g. Goiris et al. 2014; Chlipala et al. 2010; Choi, Engene, Smith, Preskin and Gerwick 2010), the majority is dedicated to freshwater species including *Spongiochloris spongiosa*, *Arthrospira platensis*, *Anabaena doliolum*, *Nostoc* sp., *Cylindrospermum* sp., *Botryococcus braunii* (e.g. Klejdus, Kopecký, Benešová and Vacek 2009; Tibbetts, Milley and Lall 2015). Goiris et al. (2014) identified phloroglucinol, phenolic acids (mainly p-

coumaric and ferulic acids) and flavone (apigenin) in the cyanobacterium *Arthrospira platensis*, and together with these compounds, isoflavones (daidzein, genistein) and a flavonol (quercetin) in 4 marine phytoplankton species of different lineages (*Diacronema lutheri* - Haptophyta, *Phaeodactylum tricornutum* - Bacillariophyta, *Tetraselmis suecica* - Chlorophyta and *Porphyridium purpureum* - Rhodophyta), with *D. lutheri* being the most diverse in terms of phenolic composition. Many bromophenols have been also identified in marine Cyanobacteria such as *Lyngbya majuscula*, *Phormidium nigroviride* and *Schizothrix calcicola* which contained bromophenol substituted with a macrodilactone, namely aplysiatoxins and derivatives (reviewed by Kornprobst 2014). Cyanobacterial cytotoxins exhibited in part a phenolic structure such as nhatrangins isolated from *Leptolyngbya majuscula* (Chlipala et al. 2010). Some bromophenols could also be sulfated such as in *L. crossbyana* which contained brominated and sulfated polyphenyl ethers, named crossbyanols A–D (Choi et al. 2010). Microalgal phenolic compounds with more complex structures are the chrysophaentin group (chrysophaentins A–H) which comprise linear and cyclic polyhalogenated bisdiarylbutenes isolated from the Chrysophyta *Chrysophaeum taylori* (Plaza, Keffer, Bifulco, Lloyd and Bewley 2010a). Finally, a well-known phenolic compound but specific to Cyanobacteria is scytonemin which is a photoprotective pigment (Garcia-Pichel and Castenholz 1991; Proteau, Gerwick, Garcia-Pichel and Castenholz 1993).

Phenolic compounds from green and red macroalgae

Green and red seaweeds contain phenolic compounds, but generally in low concentrations compared to brown seaweeds (Mabeau and Fleurence 1993; Hardouin et al. 2014). First, red seaweeds contain bromoditerpenes (Briand, Kornprobst, Al-Easa, Rizk and Toupet 1997; Ciavatta, Wahidulla, D'Souza, Scognamiglio and Cimino 2001; Etahiri, Bultel-Poncé, Caux and Guyot 2001; Awad 2004) and meroditerpenes, particularly in *Callophycus serratus* (Lane et al. 2009; Paige-Stout et al. 2010; Woolner et al. 2018). The genus *Laurencia* (divided now into *Laurencia* and *Osmundea*) belonging to Rhodomelaceae is known for its richness in sesquiterpene derivatives (Davyt et al. 2001; Masuda, Kawaguchi, Abe, Kawamoto and Suzuki 2002; Kladi et al. 2007; Cassano, De Paula, Fujii, Da Gama and Teixeira 2008; Soares 2015 for the most recent papers). Many bromophenols have also been identified in other Rhodomelaceae genera including *Osmundaria*, *Polysiphonia*, *Rhodomela* and *Symphyocladia* (Zhao et al. 2004; Wang, Okada, Shi, Wang and Okuyama 2005; De Carvalho, Guimarães and Roque 2006; Li, Li, Ji and Wang 2008a; Liu, Hansen and Lin 2011). More recently, new bromophenols derived from catechol have been isolated from *Symphyocladia latiuscula* (Xu et al. 2019). Specific phenolic compounds can also be found as tichocarpol in *Tichocarpus crinitus* (Ishii, Okino, Suzuki and Machiguchi 2004), halogenated phloroglucinol in *Rhabdonia verticillata* (Blackman

and Matthews, 1982), alkaloids with a phenol such as hordenine in *Mastocarpus stellatus* or *Phyllophora crispa* (Güven, Bora and Sunam 1970; Barwell, Canham and Guiry 1989), or bromophycolides in *Callophycus serratus* (Kubanek et al. 2006; Lane et al. 2009). Some authors also classify mycosporine-like amino acids (MAAs) as phenolic compounds (Stengel et al. 2011; Freile-Pelegrín and Robledo 2014). Mainly identified in red algae or cyanobacteria (but also in lower level in green algae), MAAs are formed by an aminocyclohexenimine or aminocyclohexenone ring to which are added different groups (Sinha, Singh and Häder 2007). Nevertheless, we did not take in consideration MAAs as phenolic compounds as they do not possess an aromatic cycle.

In green seaweeds from the class Ulvophyceae, including the three genera *Caulerpa*, *Dasycladus* and *Halimeda*, some bromophenols such as dibromophenols or simple bromated compounds have been detected (Whitfield et al. 1999). Other non-typical phenolic compounds have also been characterized, such as coumarins and trihydroxycoumarin, in green seaweeds such as *Caulerpa* spp. or *Dasycladus vermicularis* (Pérez-Rodríguez, Aguilera and Figueroa 2001; Pérez-Rodríguez, Aguilera, Gomez and Figueroa 2003). In this latter species, Kurth, Welling and Pohnert (2015) also described a sulfated, hydroxylated coumarin derivative as a storage metabolite in its activated defense against fouling organisms.

Examples of phenolic compounds found in green seaweeds, include avrainvilleol, and different bromophenols (2- or 4-), dibromophenols (2,4- and 2,6-) and 2,4,6-tribromophenol (Whitfield et al. 1999). Salicylic acid, also known as 2-hydroxybenzoic acid, was isolated from the green and calcareous *Halimeda incrasata* (Novoa et al. 2011). In this last species, ferulic acid could also be detected, albeit in a minor quantity of 8 ng/g FW (Novoa et al. 2011). Simple bromated polyphenolic compounds, together with flavonoids and catechins were isolated from *Halimeda opuntia* and *H. macroloba* (Yoshie, Wang, Hsieh and Suzuki 2002). More precisely, epigallocatechin was identified in *H. macroloba*. In another work, *H. monile* was reported to be a source of natural antioxidants including cinnamic, gallic, and caffeic acids (Mancini-Filho, Novoa, González, de Andrade-Wartha and Portari Mancini 2009). Moreover, some vanillic acid derivatives with sulfate groups, were described in another green macroalga *Cladophora socialis* (Feng et al. 2007).

Phenolic compounds from brown macroalgae

In brown seaweeds, the main phenolic compounds are the phlorotannins. These molecules are produced via the polymerization of the phloroglucinol monomer (1,3,5-trihydroxybenzene). Phlorotannins are synthesized through the acetate–malonate pathway (Targett and Arnold 1998; Shibata et al. 2004), with a molecular size ranging from 126 Da to 650 kDa (Ragan and Glombitza 1986; Ahn et al. 2007). It

seems that PKS1, a type III polyketide synthase, is responsible for the synthesis of phlorotannins (Meslet-Cladière et al. 2013). Phlorotannins constitute a heterogeneous group of molecules characterized by linkages between phloroglucinol units and the number of hydroxyl groups present on the molecule. Thus, they can be classified in four classes depending on the chemical bonds between monomers: fuhalols and phlorethols with ether linkages (Aryl-O-Aryl), fucols with phenyl linkages (Aryl-Aryl), fucophlorethols with ether and phenyl linkages and finally eckols and carmalols with dibenzodioxin linkages (Singh and Bharate 2006; La Barre et al. 2010; Stiger-Pouvreau, Jégou, Cérantola, Guérard and Le Lann 2014; Ar Gall, Lelchat, Hupel, Jégou and Stiger-Pouvreau 2015; Lemesheva and Tarakhovskaya 2018). Creis, Ar Gall and Potin (2018) classified phlorotannins into six groups with the addition of isofuhalols with para- and meta-oriented ether bonds, added to the previous list.

Generally, phlorotannins are considered to be the main phenolic compounds of brown seaweeds. Nevertheless, other aromatic derivatives have also been identified such as colpol isolated from *Colpomenia sinuosa* or phloroglucinol coupled with fatty acids including palmitic or stearic acid observed in *Zonaria farlowii* (Kornprobst 2014). Halogenated and sulfated compounds are also produced by brown seaweeds. Shibata, Hama, Miyasaki, Ito and Nakamura (2006) reported that the molecules excreted from *Eisenia bicyclis* and

Ecklonia kurome mainly consisted of three bromophenols (2,4-dibromophenol, 2,4,6-tribromophenol and dibromo-iodophenol) but not phloroglucinol or phlorotannins.

Some terpenes combined with aromatic derivatives have been reported in brown algae, similar to red and green algae (Kornprobst 2014). Algal species from the genera *Dictyopteris*, *Cystoseira*, *Sargassum* or *Halidrys* exhibited some meroterpenes, *i.e.* a coupling of hydroquinone and linear terpenic chain (Kornprobst 2014). For example, a meromonoterpene was described in

Sporochnus bolleanus; and merosesquiterpenes such as zonarol and isozonarol were found in *Dictyopteris* spp. Finally, meroditerpenes were detected in *Taonia* and *Stypopodium* (Gil et al. 1995), *Cystoseira* (Jégou, Culioli and Stiger-Pouvreau 2012), *Halidrys* (Culioli et al. 2008), *Bifurcaria* and *Sargassum* species (Kornprobst 2014).

Variability of phenolic content in space and time

The phenolic content of algae is not linear all along the year and all around the world. Many parameters, *i.e.* abiotic and biotic, influence the

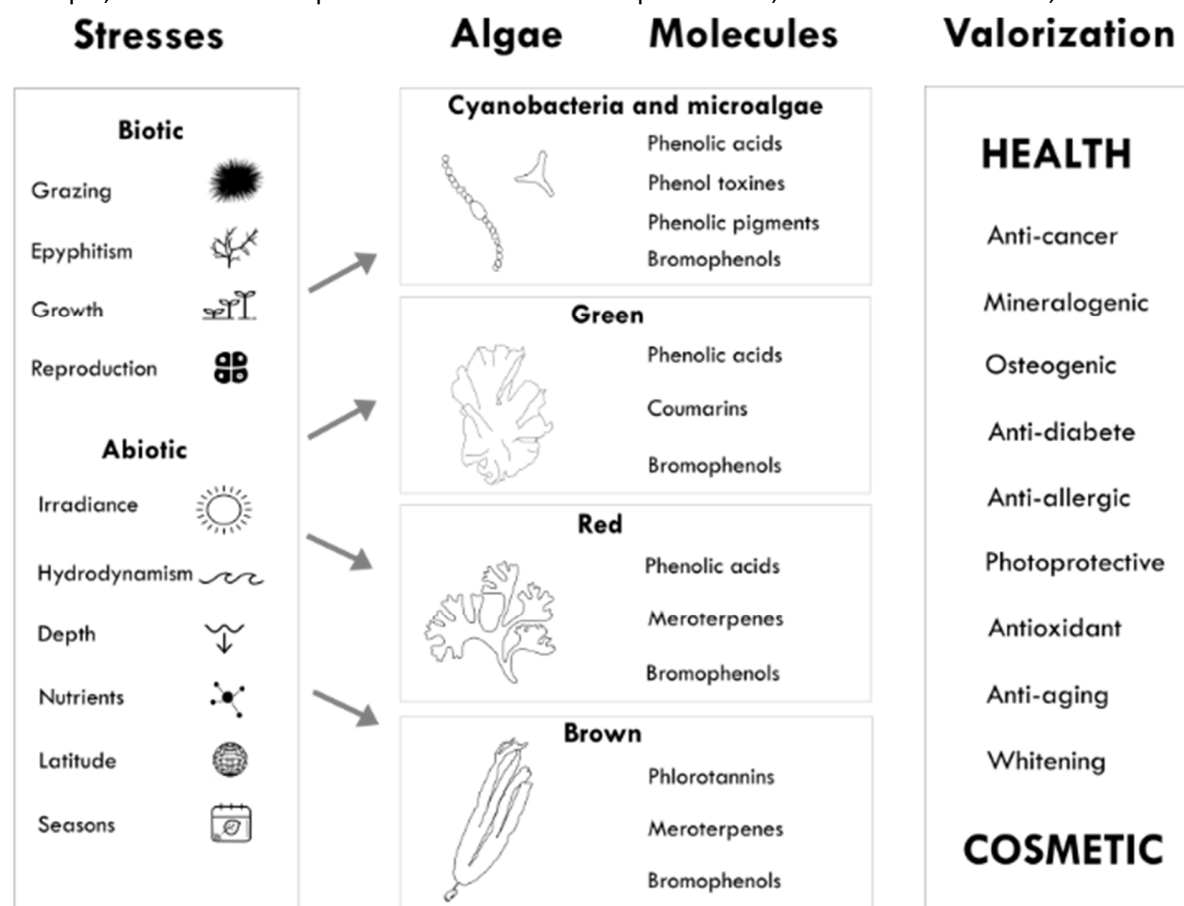


Figure 3: Conceptual model showing the impacts of several environmental parameters which influence the production and content of phenolic compounds in all algal groups presented in this review, along with potential bioactive properties of interest for the health and well-being sectors.

production of phenolic compounds. Figure 3 resumes all the abiotic and biotic factors which can influence the production of phenolic compounds in all taxonomical groups presented in this review, together with the different sectors of applications of those compounds, with references for each algal class of concern.

In Phaeophyceae, phlorotannins levels vary from 5 to 300 mg phloroglucinol equivalent/g DW (Murray et al. 2018a), depending on species (Stiger-Pouvreau et al. 2014), grazing (Pavia and Brock 2000; Svensson, Pavia and Toth 2007), epyphitism (Jennings and Steinberg 1997), ontogenic stages (Stiger, Deslandes and Payri 2004; Plouguerné et al. 2006), latitude (Targett, Coen, Boettcher and Tanner 1992; Tanniou et al. 2014), depth and nutrients (Le Lann et al. 2012a), seasons (Connan, Goulard, Stiger, Deslandes and Ar Gall 2004; Kamiya et al. 2010) or other environmental parameters such as irradiance and UV radiations (Pavia and Brock 2000; Swanson and Druehl 2002), or hydrodynamism (Plouguerné et al. 2006; Le Lann et al. 2012a). In the same way, phenolic content in microalgae and green lineages varies from ng/g DW to < 5 mg GAE/g DW for Cyanobacteria and microalgae depending on algal species and culture conditions (Klejdus, Lojková, Plaza, Šnóbllová and Štěrbová 2010; Ahmed et al. 2014; Goiris et al. 2014) and 4 to 60 mg GAE/g DW for green and red species (Cox, Abu-Ghannam and Gupta 2010; Machu et al. 2015).

Isolation and purification of phenolic compounds from algae

Importance of the pre-treatment of the biomass

To maximize the phenolic extraction yield, microalgal and cyanobacterial biomasses are pre-treated which consists mainly of cell disruption (Parniakov et al. 2015). Different disruption mechanisms have been developed with their use depending on the microalgal group due to their differences in cell-wall composition. These mechanisms have mainly been implemented during the extraction of valuable compounds of microalgae such as lipids as opposed to phenolic compounds (Prabakaran and Ravindran 2011). Two main mechanisms are employed, either physical or chemical (reviewed notably in Günerken et al. 2015 and D'Hondt et al. 2017). The physical methods consisted of thermal (high, mild or freezing temperatures, sometimes through a thermal cycle) treatment and/or mechanical disruption. The cryogrinding is an example of thermal treatment with liquid nitrogen (-196 °C) used for microalgae (Serive et al. 2012) but also macroalgae (Vandanjon et al. 2016). Mechanical pre-treatment disrupts the cell using bead milling or high pressure (such as the French press; D'Hondt et al. 2017). The use of microwaves is also increasing and its utility has been demonstrated for pigment extraction from diatoms especially chlorophyll *a*, β , β -carotene and fucoxanthin (Pasquet et al. 2011). The most extensively disruption method used for phenolic studies is actually ultrasonication (Kepekçi and Saygideger 2012; Goiris et al. 2014; Parniakov et al.

2015). Chemical cell disruption has been widely studied as it can be more selective than physical methods; however, this pre-treatment is included with the extraction itself and is thus discussed under extraction procedures below.

Extraction of phenolics from macroalgae can be directly performed on fresh algae, but often, extraction cannot be immediately carried out, for example, after seaweed sampling in isolated areas. To prevent the degradation of the compounds, different storage conditions and treatments are available including freezing, freeze-drying, sun or oven drying. Le Lann, Jégou and Stiger-Pouvreau (2008) studied several storage condition treatments on two brown Fucales. They reported that oven- and greenhouse-drying reduced by around 50% the phenolic contents, respectively for *Sargassum muticum* and *Bifurcaria bifurcata*, due to the high temperatures. Freeze-drying and freezing at -20°C appeared to be good alternatives to conserve extracts mostly for thermosensitive compounds such as phenolic compounds. Indeed, Chan, Cheung and Ang (1997) reported that contact with air and high temperatures during sun- and oven-drying impacted the nutritional composition of *Sargassum hemiphyllum*. *Ecklonia cava* extracts exhibited a higher yield of phlorotannins after freeze-drying than sun-drying (Chowdhury et al. 2011).

Extraction procedures

Prior to the extraction of active compounds, another important step may include the grinding of

seaweed: by reducing the particle size, the surface area in contact with the solvent is increased and thus the extraction rate (Abu-Ghannam and Rajauria 2013). Seaweeds are often ground or crushed using mechanical force such as a blender when mixed with solvent, manually or using a hammer-mill or Wylie Mill using a mesh screen of known size (Michalak and Chojnacka 2014).

Protocols for the extraction of phenolic compounds are widely variable. Historically, and still today, maceration or grinding were used with various solvent mixtures to obtain extracts enriched in phenolics from all algal groups (Stiger-Pouvreau et al. 2014). Thus, the amount of phenolic compounds obtained by solid/liquid extraction depended on the solvent used (often methanol diluted with water) but also on the temperature, extraction time or pH (Koivikko et al. 2005; Leyton et al. 2016; Creis et al. 2018). Creis et al. (2018) reviewed solid/liquid extraction of phlorotannins with different parameters including type of solvent, temperature or time. Similarly, when Stiger-Pouvreau et al. (2014), Ar Gall et al. (2015), and Le Lann et al. (2016) reviewed protocols for extraction of brown seaweeds, and Surget et al. (2016; 2017) for green seaweeds, these authors presented solid/liquid extraction protocols followed by a liquid/liquid purification procedure which resulted in concentrated and very active phenolic fractions. However, these classical extraction protocols are time and energy consuming (Ibañez et al. 2012). Thus, in recent years, new extraction techniques

have been developed, with an increased interest for green and thereby food-safe extractions, in particular for the valorization of polyphenols as bioactive compounds for dietary or human health (Wijesinghe and Jeon 2012a).

According to Chemat, Vian and Cravotto (2012), “green extractions are based on the discovery and design of extraction processes which will reduce energy consumption, allow use of alternative solvents and renewable natural products, and ensure a safe and high quality product”. First, the solvents can be changed to less hazardous choices such as water or ethanol or a mix of both solvents as demonstrated by Prat et al. (2016), or the use of deep eutectic solvents (DES; i.e. *eutectic* mixtures of Lewis or Brønsted acids and bases which can contain a variety of anionic and/or cationic species) can also be an alternative to organic solvents and have the potential to extract phenolic compounds (Ruesgas-Ramón, Figueroa-Espinoza and Durand 2017). The most common DESs are formed by combining choline chloride with most often urea, ethylene glycol or glycerol (Ruesgas-Ramón et al. 2017). Table 1 outlines different green extractions for obtaining brown seaweed extracts rich in phlorotannins. Reviews from Esquivel-Hernández et al. (2017), Cikoš, Jokić, Šubarić and Jerković (2018) and Gallego, Montero, Cifuentes, Ibáñez and Herrero (2018) highlighted the main green extraction technologies for algae which included supercritical fluid extraction (SFE), microwave assisted extraction (MAE), pressurized liquid

extraction (PLE) and ultrasound assisted extraction (UAE). All of these methods have many advantages, such as shorter times, less solvent, and higher extraction rates. Enzyme assisted extraction (EAE) (Wijesinghe and Jeon 2012b; Kadam, Tiwari, Smyth and O'Donnell 2015b), centrifugal partition chromatography (CPC) (Tanniou et al. 2013), liquid biphasic systems (LBS; Chia, Show, Phang, Ling and Ong 2018) or ionic liquids (IL; Vo Dinh, Saravana, Woo and Chun 2018) were also investigated as green extraction protocols to extract phlorotannins.

The use of EAE for marine algae has rarely been reported. Wang et al. (2010) reported a positive effect of proteases, e.g. Protamex® and Flavourzyme® (Novozymes; www.novozymes.com), on the extraction of polyphenols from the red macroalga *Palmaria palmata*. On the other hand, Hardouin et al. (2014), working with three abundant macroalgal species in Brittany, *Sargassum muticum*, *Solieria chordalis* and *Ulva* sp. reported that enzymatic hydrolysis was not efficient for the extraction of phenolic compounds compared to the extraction without enzymatic hydrolysis, but it did improve the isolation of proteins and polysaccharides. In addition to conventional chemical methods (the use of acids, alkali or different solvents) new extraction protocols have been developed for use with macro-, microalgae and cyanobacteria, including the use of supercritical fluids such as CO₂ tested to extract benzoic acid derivatives,

hydroxybenzaldehydes and cinnamic acid derivatives from *Spongiochloris spongiosa*, *Arthrospira (Spirulina) platensis*, *Trichormus (Anabaena) doliolum*, *Nostoc* sp. and *Cylindrospermum* sp. (Klejdus et al. 2009); the use of supercritical CO₂ was sometimes coupled with ultrasonication tested to extract isoflavones on *Sargassum muticum*, *Sargassum vulgare*, *Hypnea spinella*, *Porphyra* sp., *Undaria pinnatifida*, *Chondrus crispus*, *Halopythis incurva*, *Spongiochloris spongiosa*, *Scenedesmus* sp. and *Nostoc* sp. (Klejdus et al. 2010). On the other hand, ionic liquids such as the co-solvent 1-ethyl-3-methyl imidazolium methyl sulfate and methanol have not yet been applied to extraction of phenolic compounds but they seem promising and already used for lipids (Young, Nippgen, Titterbrandt and Cooney 2010). When using SFE protocols, the main drawback with CO₂ has been its low polarity, which is not conducive to phlorotannin extraction (Kadam, Álvarez, Tiwari and O'Donnell 2015a). Nevertheless, to increase SFE solvation power, polar modifiers (e.g. methanol or ethanol) have been used to increase the polarity of the supercritical fluid to extract these phenolic compounds (Ibañez et al. 2012; Tanniou et al. 2013). Some works have nevertheless been done to extract phenolic compounds from algae: for example Tanniou et al. (2013), Conde, Moure and Domínguez (2015) and Saravana et al. (2017) focused on phenolic compounds from *Sargassum muticum* and *Saccharina japonica*. While Pressurized Liquid Extraction (e.g. high

temperature combined with high pressure) can extract a wide spectrum of compounds such as phenols, this technique is less selective and requires more purification steps (Ibañez et al. 2012; Kadam et al. 2015a). For example, to extract phenolics from *Arthrospira platensis*, Esquivel-Hernández et al. (2017) advised the use of MAE or PLE followed by SFE. Further advantages and disadvantages of these different extraction techniques have been reviewed by Kadam et al. (2015a). Da Silva et al. (2017) compared different extraction methodologies for phenolic and flavonoid yields from the Cyanobacteria *Arthrospira platensis*: HPTE which is equivalent to PLE, i.e. high pressure and high temperature, UAE and MAE. They concluded that PLE using ethanol at 90°C and 2.5 bar in a stirred reactor was the most efficient method to extract a higher polyphenol yield (~3.5 mg of gallic acid equivalent/g DW), whereas flavonoids were better extracted using MAE with ethanol at 60 W for 60 min (~2.8 mg of catechin equivalent/g DW). Liquid Biphasic System (LBS) is also another alternative extraction compared to conventional extraction. There are several types of LBS such as a mix of polymer/salt, alcohol/salt or polymer/polymer (Chia et al. 2018).

Table 1. Examples of green extractions to obtain extracts enriched in phlorotannins from brown seaweeds

<i>Green extraction</i>	<i>Species</i>	<i>References</i>
PLE	<i>Alaria esculenta, Asperococcus bullosus, Bifurcaria bifurcata, Cystoseira tamariscifolia, Desmarestia ligulata, Dictyota dichotoma, Fucus ceranoides, Halidrys siliquosa, Saccorhiza polyschides</i>	Zubia et al. 2009
	<i>Ascophyllum nodosum</i>	O'Sullivan et al. 2013, Tierney et al. 2013b
	<i>Fucus spiralis</i>	Tierney, Soler-Vila, Croft and Hayes. 2013a, Tierney et al. 2013b
	<i>Fucus serratus</i>	Zubia et al. 2009, O'Sullivan et al. 2013, Heffernan, Smyth, Fitzgerald, Soler-Vila and Brunton. 2014
	<i>Himanthalia elongata</i>	Plaza et al. 2010
	<i>Laminaria digitata</i>	Heffernan, Smyth, Fitzgerald, Soler-Vila and Brunton. 2014
	<i>Padina pavonica</i>	Fayad et al. 2017
	<i>Pelvetia canaliculata</i>	Tierney et al. 2013b
	<i>Saccharina japonica</i>	Vo Dinh, Saravana, Woo and Chun 2017
	<i>Sargassum muticum</i>	Tanniou et al. 2013, Pilar Sánchez-Carmargo et al. 2016
MAE	<i>Undaria pinnatifida</i>	Onofrejová et al. 2010
	<i>Ascophyllum nodosum, Saccharina japonica, Lessonia trabeculata, L. nigrescens</i>	Yuan et al. 2018
	<i>Carpophyllum flexuosum, C. plumosum</i>	Magnusson et al. 2017, Zhang et al. 2018
	<i>Ecklonia radiata</i>	Charoensiddhi, Franco, Su and Zhang 2015, Magnusson et al. 2017, Zhang et al. 2018
	<i>Padina pavonica</i>	Fayad et al. 2017
EAE	<i>Saccharina japonica</i>	He et al. 2013
	<i>Sargassum vestitum</i>	Dang, Bowyer, Altena and Scarlett 2018
	<i>Ecklonia radiata</i>	Charoensiddhi, Franco, Su and Zhang 2015
	<i>Sargassum aquifolium, S. ilicifolium,</i>	Puspita et al. 2017

	<i>S. polycystum</i>	
	<i>Sargassum muticum</i>	Rodrigues et al. 2015, Vandanjon et al. 2016, Pilar Sánchez-Carmargo et al. 2016
UAE	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Kadam, Tiwari, Smyth and O'Donnell 2015, Moreira, Sineiro, Chenlo, Arude and Díaz-Varela 2017, Agregán et al. 2017a
	<i>Ecklonia cava</i>	Lee, Kang, Moon, Jeon and Jeon 2013
	<i>Fucus vesiculosus, Bifurcaria bifurcata</i>	Agregán et al. 2017a
	<i>Sargassum muticum</i>	Rodrigues et al. 2015
SFE	<i>Saccharina japonica</i>	Saravana et al. 2017
	<i>Sargassum muticum</i>	Tanniou et al. 2013, Conde, Moure and Domínguez 2015
CPC	<i>Ecklonia cava</i>	Lee et al. 2014, 2015
	<i>Ishige okamurae</i>	Kim et al. 2016
	<i>Sargassum muticum</i>	Tanniou et al. 2013
LBS	<i>Padina australis, Sargassum binderi</i>	Chia, Show, Phang, Ling and Ong 2018
IL	<i>Saccharina japonica</i>	Vo Dinh, Saravana, Woo and Chun 2017

In Chia et al. (2018), they focused on the extraction of phlorotannins with an alcohol/salt LBS method on *Padina australis* and *Sargassum aquifolium* (*S. binderi*) and found the best combination of alcohol/salt being 2-propanol and ammonium sulphate for the phlorotannin extraction. The Centrifugal Partition Chromatography (CPC) or Centrifugal Partition Extraction (CPE) can be also used to extract phenolic compounds from seaweeds (Tanniou et al. 2013; Lee et al. 2014; 2015; Kim et al. 2016). According to Tanniou et al. (2013), the CPC used with the solvent mix of ethyl acetate and water (50/50) permitted to obtain the best yield in phenolic compounds compared to SFE and PLE (22.90, 3.45 and around 10 % DW, respectively). The best activities were also highlighted with CPC (IC50 of 0.52 mg/mL for CPC, 28.31 mg/mL for SFE and 0.80 mg/mL for PLE with DPPH assay). Lee et al. (2014; 2015) have succeeded to extract phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava* (dieckol, phlorofucofuroeckol A, 2,7-phloroglucinol-6,6-bioeckol and pyrogallol-phloroglucinol-6,6-bioeckol) with the CPC method with a two-phase solvent system comprising n-hexane:ethyl acetate:methanol:water (2:7:3:7, v/v). Another study extracted phlorotannins from *Ishige okamurae* with the CPC using the same solvent system as Lee et al. (2014; 2015) but with a different ratio 0.5:10:4:6 (v/v) (Kim et al. 2016).

Quantification and analyses of phenolic compounds

The quantification and analyses of algal polyphenols is further complicated by the difficulty of separating and isolating them from other compounds naturally occurring *in vivo* (Freile-Peegrín and Robledo 2014). Polyphenols are generally quantified using different spectrophotometric methods based on reaction of a colored reagent with the phenolic functional group(s). Those methods are summarized, especially for phlorotannins, in the recent review of Ford, Theodoridou, Sheldrake and Walsh (2019). The most common assay is the Folin-Ciocalteu method (Waterman and Mole 1994), based on phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as the color reagents and phloroglucinol (for brown seaweeds) or gallic acid (for green and red seaweeds) as the reference standards for calibration. However, colorimetric assays are non-specific and thus detect all phenolic hydroxyl groups in the extract, desired or otherwise (Stiger-Pouvreau et al. 2014; Kirke et al. 2017). Another colorimetric method using aluminium chloride has been used for flavonoid quantification (Safafar, Van Wagenen, Møller and Jacobsen 2015; Da Silva et al. 2017). These colorimetric methods provide little information about the chemical composition of the phenolic content. In this sense, purification steps are needed to obtain more concentrated extracts, and information on the chemical composition of phlorotannins and/or to

characterize their chemical structures. Different methods exist to separate/purify phenolics, such as liquid/liquid extraction, solid phase extraction (SPE), ultrafiltration, dialysis, thin layer chromatography (TLC) and high pressure liquid chromatography (HPLC) (Le Lann et al. 2012a; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Creis et al. 2018). These methods separate molecules according to their polarity or size, in order to enrich fractions or to isolate individual compounds (Vandanjon, Hersant, Tanniou, Guérard and Stiger-Pouvreau 2017). Following separation, phenolic compounds can be identified or characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), nuclear magnetic resonance (NMR) and/or mass spectrometry (MS). Combined with HPLC, these detection methods offer a rapid way to identify and quantify these molecules (Ferrerres et al. 2012; Steevensz et al. 2012; Goiris et al. 2014; Karthik, Manigandan, Sheeba, Saravanan and Rajesh 2016; Le Lann et al. 2016; Rajauria, Foley and Abu-Ghannam 2016; Agregán et al. 2017b; Rajauria 2018; Gonçalves-Fernández, Sineiro, Moreira and Gualillo 2019). However, for phlorotannins, their structural characterization and identification is difficult due to their complexity, polymeric nature, instability, rapid oxidation or their ability to complex with others molecules (Stiger-Pouvreau et al. 2014).

Biological properties of phenolic compounds in health, well-being and cosmetics

Due to their great diversity, phenolics have demonstrated many different bioactivities *in vitro* and *in vivo* (Cornish and Garbary 2010; Thomas and Kim 2011; Wijesinghe and Jeon 2011; 2012a; Catarino, Silva and Cardoso 2018). For microalgae and cyanobacteria, where phenolics are minor constituents (less than 0.1 mg/g DW; Goiris et al. 2014), biological activities have often been demonstrated on crude or purified extracts but only a few examples have been published on biological activities of purified and structurally identified phenolic compounds such as benzoic and cinnamic acid derivatives (Stevenson et al. 2002; Choi et al. 2010; Plaza et al. 2010a; Davison and Bewley 2019). Phlorotannins are amongst the most studied phenolic compounds with many reports focused on their biological properties as opposed to other algal phenolic compounds (Gupta and Abu-Ghannam 2011a; Li, Wijesekara, Li and Kim 2011; Thomas and Kim 2011; Wijesinghe and Jeon 2011; Imbs and Zvyagintseva 2018).

Antioxidant properties

In normal conditions, organisms are able to regulate their metabolism to maintain very low levels of reactive oxygen species (ROS) or more common free radicals that has a single electron, i.e. unpaired, which are involved in many cellular functions including respiration (Apak, Özyürek, Güçlü and Çapanoğlu 2016). Thus, production of ROS and their elimination are well balanced via

endogenous antioxidant enzyme systems and molecules. However, in some circumstances, including in response to environmental pressures or oxidative stress, this balance may be disrupted, and consequently, these unstable molecules are produced in excess (Wijesinghe and Jeon 2012a; Lushchak 2014). In particular, oxidative stress plays a critical role in the pathogenesis of various chronic diseases including cancers, atherosclerosis, ischaemic injury, inflammation and neurodegenerative disorders (Kang et al. 2005; Reuter, Gupta, Chaturvedi and Aggarwal 2010). Therefore, the body requires antioxidants, i.e. molecules whose role is to scavenge or quench free radicals, inhibit initiation of peroxidation, and prevent or reduce cell damage from ROS and other reactive species (Surh 2005). Dietary sources of antioxidants may be natural or artificial, although in recent years, the importance of replacing artificial antioxidants with natural ingredients has increased considerably, for increased safety and improved human health (Gupta and Abu-Ghannam 2011b; Farvin and Jacobsen 2013; Chakraborty et al. 2015). Synthetic antioxidants such as BHA (butylated hydroxyanisole) or BHT (butylated hydroxytoluene) are widely used in the food industry (Gupta and Abu-Ghannam 2011b), but they have been reported to be cytotoxic and exerting carcinogenic effect (Chen et al. 1992). In this sense, natural phenolics from seaweeds have been reported to act as antioxidants and they seem to be a good alternative to synthetics (Agregán et al. 2018). It has been widely demonstrated that

phenolic or phlorotannin levels of seaweed extracts are correlated with antioxidant activity (Jiménez-Escrig, Jiménez-Jiménez, Pulido and Saura-Calixto 2001; Connan et al. 2004; Duan, Zhang, Li and Wang 2006; Matanjun, Mohamed, Mustapha, Muhammad and Ming 2008) and that this activity depended on their structure, and especially for phlorotannins, on the degree of polymerisation of phloroglucinol (Nakamura, Nagayama, Uchida and Tanaka 1996; Kirke et al. 2017).

Studies evaluating antioxidant activity can be divided into two major groups, those using methods based on single electron transfer (SET) and those based on hydrogen atom transfer (HAT) (Huang and Prior 2005; Apak et al. 2016). Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), inhibition of lipoperoxidation or β -carotene assays are examples of HAT assays, while Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]), Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) or 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺) assays are SET methods (Sun, Yang and Tsao 2018). Phlorotannins of brown seaweeds such as dieckol or fucophlorethol have been reported to possess high antioxidant activity, often with a higher activity than other polyphenols such as flavonoids derived from terrestrial plants (e.g. Agregán et al. 2017a). Phlorotannins were also reported to have a higher antioxidant activities than other phenolics such as phenolic acids from red or green algae;

although other studies have reported high phenolic contents and antioxidant activities in some red species, including *Chondria baileyana* (Zubia, Robledo and Freile-Pelegrin 2007), *Polysiphonia stricta* (Duan et al. 2006), *Symphyclocladia latiuscula* (Zhang, Duan, Huang, Zhang and Wang 2007) or *Mastocarpus stellatus* (Farvin and Jacobsen 2013) for red algae and *Avrainvillea longicaulis* (Zubia et al. 2007), *Halimeda incrassata* (Fallarero, Loikkanen, Mansito, Castañeda and Vidal 2003), *Ulva prolifera* (Cho, Lee, Kang, Won and You 2011), *Ulva compressa* (Cho, Kang, Won, Lee and You 2010; Paiva, Lima, Neto, Marcone and Baptista 2016), *Capsosiphon fulvescens* (Cho et al. 2010), *Ulva rigida* (Paiva et al. 2016), and *Caulerpa* spp. (Santoso, Yoshie-Stark and Suzuki 2004; Cavas and Yurdakoc 2005; Matanjun et al. 2008) for green species.

There have been several reviews of papers demonstrating antioxidant activities of brown seaweed extracts (Wijesinghe and Jeon 2011; Balboa, Conde, Moure, Falqué and Domínguez 2013; Murray et al. 2018a; Qin 2018) and also isolated phlorotannins (Nakamura et al. 1996) using *in vitro* assays. As results can be variable, it is important to perform different assays (SET and HAT) to validate the potential antioxidant activity as the observed differences may be due to the reaction conditions and duration (Audibert, Fauchon, Blanc, Hauchard and Ar Gall 2010). The antioxidant activities of individual phlorotannins have rarely been explored except for some isolated

from *Ecklonia cava* and *Eisenia bicyclis* (Murray, Dordevic, Ryan and Bonham 2018b). Recently, Hermund et al. (2018) analyzed the antioxidant capacity of enriched fractions of *Fucus vesiculosus* using chromatography with an electrochemical detector followed by mass spectrometry. They measured the ability of individual fractions to donate an electron and provided information of their antioxidant capacity using an on-line cyclic voltammetry approach. They showed that low molecular phlorotannins such as an isomer of fucophlorethol with 3 phloroglucinol units exhibited higher antioxidant capacities, but a decreasing capacity when phlorotannins were polymerized such as fucophlorethol with six or seven phloroglucinol units (Murray et al. 2018b). Although those phlorotannins have exhibited a strong *in vitro* efficacy, their activity is unclear in humans, although some studies have been performed on cell lines (Kang et al. 2005; 2012b; Heo and Jeon 2009; Pinteus et al. 2017). For example, Pinteus et al. (2017) reported that *Fucus spiralis* fractions, obtained with methanol or dichloromethane, decreased H₂O₂ levels (responsible for antioxidant stress) in human cells (MCF-7) by 50.64% and 46.71% respectively. Similar results were found for other cell lines including murine hippocampus cell line (HT22), Chinese hamster lung fibroblast line (V79-4), cells of a monkey kidney fibroblast line (Vero) by Kang et al. (2005; 2012a) and Heo and Jeon (2009) respectively, and with other brown seaweeds *Ecklonia cava*, *Ishige okamurae*. In brown algae

including *Cystoseira crinita* meroterpenes (i.e a coupling of hydroquinone and linear terpenic chain) such as tetraprenyltoluquinone derivatives, tetra- or triprenyltoluquinol derivatives also demonstrated antioxidant activities with *in vitro* assays (Fisch, Böhm, Wright and König 2003).

Even if the direct consumption of algae for their natural antioxidants is recommended (Cornish and Garbary 2010), the literature on the direct beneficial human health effects of marine algal polyphenols is sparse as showed previously with many *in vitro* assays, and few experiments have been conducted using *in vitro* assays simulating human digestion system (reviewed in Murray et al. 2018b and Qin 2018). Indeed, while the antioxidant benefits associated with the consumption of various terrestrial plants from epidemiological studies have long been accepted, there are relatively few studies on the potential impact of consumption of algae on human health (e.g. Scalbert, Manach, Morand, Rémésy and Jiménez 2005).

With regard to the potential application of algal polyphenols in cosmetics or cosmeceuticals sector, antioxidant activities have also been evaluated studying creams and oils (Balboa et al. 2014; Poyato et al. 2016). Balboa et al. (2014) evaluated the antioxidant activity of *Sargassum muticum* and *Ulva lactuca* extracts in model emulsions and oils after 35 days storage at 50°C. They measured the peroxide value (PV) which quantified hydroperoxides (primary oxidation) and the p-

anisidine values (PA) which measured the production of aldehydes (secondary oxidation) during oxidation of fats or oils from the extract/emulsion. The Total Oxidation value (TOTOX), which is calculated as $2PV + PA$ (Wan, Bahruddin and Boey 2009), was used to estimate the oxidative deterioration of lipids, as well as the primary and secondary oxidation products. After 34 days of storage, the seaweed extract, i.e. from the brown seaweed *S. muticum* and the green seaweed *U. lactuca*, inhibited lipid oxidation evaluated by the PV and the amount of volatile compounds (their presence reflects a degradation of lipids) more effectively in avocado cream (93.96%), than in shower oil (58.58%) and in massage oil (13.90%). Another study evaluated the oxidative stability of a skin care emulsion with *Fucus vesiculosus* extract (Poyato et al. 2016): when the extract was included in the emulsion, the color changed more extensively when the cream was exposed under high temperature than the unheated control. Similar to Balboa et al. (2014), water and acetone extracts of *F. vesiculosus* showed protective effects against oxidation, more precisely thermooxidation, i.e. oxidation induced by temperature, but the only water extract showed against photooxidation, i.e. oxidation induced by light (Poyato et al. 2016). Taken together, the literature indicates that algal polyphenols and in particular, the phlorotannins, exhibit strong SET and HAT antioxidant activities *in vitro*. The next steps should endeavor to demonstrate this activity *in vivo*.

Anti-allergic and anti-inflammatory properties

Allergic and hypersensitivity reactions represent significant health challenges worldwide and the complexity, frequency and severity of reactions continue to be concerns due to a variety of factors (environment, genetics, hygiene, diet, etc.) known to have an impact on their development (Singh, Holvoet and Mercenier 2011; Pawankar 2014). They constitute systemic immune responses to various allergens, which encompass skin, food, and respiratory allergies and hypersensitivities. The molecular and cellular mechanisms responsible for these allergies are complex and patients with asthma and allergies frequently experience a reduced life quality due to co-existing disorders, including diabetes, obesity, and cardiovascular disease (Pawankar 2014). In particular, asthma is a complex inflammatory disease of the airways that affects approximately 300 million people worldwide (Lambrecht and Hammad 2015).

In response to an allergen, allergic individuals synthesize large amounts of antigen-specific Immunoglobulin E (IgE) antibodies (Bousquet et al. 2008). The IgE bind to granulocytes (eosinophils and basophils) or mast cells (also known as mastocytes) which then degranulate and cause the release of mediators such as histamines, β -hexosaminidase and eicosanoids which are responsible for allergic reactions (anaphylactic shock), or inflammatory responses (Larsen, Broge and Jacobi 2016). Allergic symptoms can be difficult to control in all patients with pharmacotherapies

such as norepinephrine alone (Larsen et al. 2016). Allergy desensitization (immunotherapy) is another way to fight against this chronic health condition by attempting to change or lessen the response to allergen exposure and thereby, building immunological tolerance (Larsen et al. 2016). The search for molecules with anti-allergenic and anti-inflammatory potential constitute a major opportunity. Currently, few algal polyphenols are used for their anti-allergenic activities, the majority being polyphenols, such as epigallocatechine derivatives from terrestrial plants including Japanese or Taiwanese tea (*Camellia sinensis*) (Maeda-Yamamoto and Tachibana 2012). The proposed mechanism of action of these terrestrial polyphenols are notably the suppression of tyrosine phosphorylation of cellular protein kinase, and the suppression of myosin light chain phosphorylation (Maeda-Yamamoto and Tachibana 2012). Recently, an ethanol extract of the brown macroalga *Scytosiphon* sp. showed great anti-allergenic activity ($IC_{50} = 0.67 \text{ mg mL}^{-1}$) similar to the positive control epigallocatechin gallate (EGCG) ($IC_{50} = 0.56 \text{ mg mL}^{-1}$) using enzyme assay (Chen, Lin, Li and Mou 2015).

In order to test the anti-allergenicity of a compound, experiments are generally performed on rodent (RBL-2H3, murine model) or human (KU812) mast cells (Girish and Kemparaju 2007; Shim, Quang-To, Lee and Kim 2009; Ahn et al. 2015; Chen et al. 2015). Degranulation studies,

measurement of the level of histamine, β -hexosaminidase or eicosanoids, and investigation of the activity of enzymes involved in the allergic reaction (such as hyaluronidase (HA), phospholipase A2 (PLA2), cyclooxygenases (COX-1 and COX-2), lipoxygenase (LOX) are different methodologies to test the anti-allergenic or anti-inflammatory efficacy of a seaweed extract (Girish and Kemparaju 2007; Chen et al. 2015). The regulation of IgE-receptors on rodent or human mast cells is another methodology which permits the elucidation of the mechanism of the anti-allergenic molecules (Shim et al. 2009; Ahn et al. 2015). Several studies, mainly on brown seaweeds, have reported an anti-allergenic effect of phlorotannins in crude or purified extracts, or isolated that seem to be promising molecules against allergies and inflammation (Sugiura, Takeuchi, Kakinuma and Amano 2006b; Samee, Li, Lin, Khalid and Guo 2009; Shim et al. 2009; Sugiura et al. 2009; Sugiura, Torii, Tanaka and Matsushita 2012). Firstly, crude methanolic extracts of *Ecklonia cava*, *Eisenia arborea*, *Sargassum ringgoldianum*, *Ishige foliacea*, *I. okamurae*, *S. thunbergii* and *S. micracanthum* exhibited anti-allergenic activities by inhibiting the degranulation of mast cells (decreasing histamine release; Sugiura et al. 2006b). The anti-allergenic activities of *E. cava* extracts were confirmed by Shim et al. (2009) in a study of the regulation of IgE-receptors. Moreover, Sugiura et al. (2009) demonstrated that a methanol:chloroform extract of *Eisenia arborea* decreased the quantity of eicosanoids, leukotriene

and prostaglandin (produced by stimulating the cells using antigen-antibody reaction on RBL-2H3 cells) responsible for inflammation. These authors also reported that an extract from *Ecklonia stolonifera* inhibited β -hexosaminidase release and enzymes involved in the inflammatory response (HA, COX-2, LOX, PLA2) in mast cells, linked to the extract phlorotannin content (Sugiura et al. 2012). Samee et al. (2009) reported that an ethanol extract from *Sargassum tenerrimum* exhibited anti-hyaluronidase activities performed with a colorimetric assay. The results obtained by Chen et al. (2015) also indicated that a *Scytosiphon* sp. hydroethanolic extract enriched in phlorotannins had a higher anti-hyaluronidase activity than the typical anti-allergic drug Disodium Cromoglycate (DSCG).

Several ethanolic extracts containing phenolics derived from red algae also presented anti-allergenic activities. For example, Chen et al. (2015) screened the anti-allergenic activity of five algal species including the red macroalga *Porphyra* sp., and reported an anti-allergenic activity from its ethanolic extract but ten-times lower than the positive control (IC₅₀ = 6.86 and 0.56 mg. mL⁻¹, respectively). Moreover, an *in vivo* study in female C57BL/6 mice sensitized and stimulated by ovalbumin, an egg white allergen, reported for the first time that the red macroalga *Chondrophycus undulatus* exhibited therapeutic potential for fighting bronchial asthma notably by their inhibitory activities on all aspects of asthmatics

inflammation process (Jung et al. 2009). Methanolic extracts from the green macroalga *Codium fragile* exhibited anti-inflammatory effects on lipopolysaccharide-stimulated murine macrophage RAW 264.7 cells, in attenuating edema and erythema values in cell incubation tests with the *Codium fragile* methanol extract (Kang, Choi, Park and Kim 2012b). In another study, Khan et al. (2008) demonstrated that mouse ear edema and erythema (induced by phorbol myristate acetate) were both suppressed by a topical application to the inner side of the mouse ear of methanolic extracts from the brown seaweed *Undaria pinnatifida* and the green macroalga *Ulva linza*.

Similar to the above discussion on algal crude extracts of phenolic compounds, purified fractions with a high phenolic content were promising for anti-allergenic properties; for example, Barbosa et al. (2018) reported that *Fucus serratus* and *F. guiryi* fractions inhibited β -hexosaminidase and histamine release from RBL-2H3 cells. The effects of these extracts were partly explained by their phlorotannin contents. In another study from the same laboratory, fractions from *F. guiryi*, *F. serratus*, *F. spiralis* and *F. vesiculosus* also inhibited LOX in a cell-free system (Barbosa et al. 2017). A purified diethyl ether fraction from *Sargassum fusiforme* exhibited anti-allergenic activities on *in vitro* and *in vivo* models (Sugiura et al. 2016): the mouse ear swelling induced by three different sensitizers disappeared from 47 to 61 % at a dose

of 0.1 mg/mouse upon to the oral administration of which seaweed fractions enriched in phlorotannins. Moreover, this extract also exhibited an inhibitory effect on PLA₂, COX-2 and LOX activities with enzyme assays and the strongest inhibition of HA activity.

Isolated phlorotannins have also been reported to exhibit anti-allergenic activities: Sugiura et al. (2006a) reported that phlorotannins (i.e. 6,6'-bioeckol, 6,8'-bioeckol and 8,8'-bioeckol and phlorofucofuroeckol A and B) isolated from *Eisenia arborea* had anti-allergenic effects determined by inhibition of histamine release from RBL cells stimulated by the antigen-antibody reaction. Phlorofucofuroeckol-B (PFF-B) had the strongest activity: 2.8 fold greater than other inhibitors such as epigallocatechin gallate (EGCG) (Sugiura et al. 2006a; 2007). These authors reported that the anti-allergenic activities of the phlorotannins was positively associated with molecular weight and the number of hydroxyl groups as demonstrated with PFF-B. Phlorotannins (i.e. eckol, PFF-A, dieckol and 8,8'-bioeckol) from *Eisenia bicyclis* exhibited similar activities with an inhibition of eicosanoids such as PLA₂, LOX and COX determined with *in vitro* assay (Shibata, Nagayama, Tanaka, Yamaguchi and Nakamura 2003). Li, Lee, Le, Kim and Kim (2008b) isolated three phlorotannins from *Ecklonia cava* with anti-allergenic activities: eckol showed the strongest activity followed by PFF-A and fucodiphloretol G (FG) assessed using histamine and β -hexosaminidase release from mast cells.

Other phlorotannins with anti-allergenic activities were isolated from *E. cava*, ranked in increasing order of activity: 6,6'-bioeckol (6B); dieckol; 1-(3',5'-dihydroxyphenoxy)-7-(2'',4'',6-trihydroxyphenoxy)-2,4,9-trihydroxydibenzo-1,4-dioxin (DTTD) and phloroglucinol. They showed inhibition of histamine and β -hexosaminidase release on RBL-2H3 and KU812 (Le, Li, Qian, Kim and Kim 2009). Ahn et al. (2015) also reported that dieckol from *E. cava* exhibited anti-allergenic activities with *in vitro* and *in vivo* assays. Finally, fucophlorethol C, isolated from *Dactylosiphon bullosus*, exhibited inhibition of LOX with an *in vitro* assay (Kurihara, Konno and Takahashi 2015); the authors concluded that free phenolic hydroxyl groups were important for the allergenic activity associated with blocking the activity of the LOX. A meroditerpene extracted from *Styopodium flabelliforme*, epitaondiol, exhibited anti-inflammatory activities via decreased eicosanoids release and PLA2 activity in human neutrophils (Gil et al. 1995).

Red seaweeds are also rich in anti-inflammatory compounds, such as the bromophenol metabolites vidalol A and B in *Vidalia obtusaloba* that showed significant reduction in edema (58-82%) when applied topically to phorbol ester (PMA) - induced swelling of the mouse ear and significant inhibition of the PLA2 in enzyme assay (Wiemer, Idler and Fenical 1991), or catechol from *Porphyra dentata* that inhibited the production of nitric oxide (NO), a signaling molecule that plays a key role in the

pathogenesis of inflammation (Kazlowska, Hsu, Hou, Yang and Tsai 2010). The inhibitory capacity of phenolic compounds against bee venom derived PLA2 activity in enzyme tests were also highlighted in green algae: for example, Mayer et al. (1993) isolated two sesquiterpenes: bromohydroquinone cymopol from *Caulerpa prolifera* and cyclocymopol from *Cymopolia barbata* that exhibited inhibition of PLA2 in enzyme tests. Interestingly, Silva, Pereira, Valentão and Andrade (2017) reviewed all the PLA2 inhibitors from marine organisms and discussed that algae represent a good potential source of these inhibitors.

Anti-diabetic, anti-obesity properties and cardiovascular protection

Worldwide, obesity and diabetes are considered two of the most prevalent metabolic diseases (Wild, Roglic, Green, Sicree and King 2004; James, Leach, Kalamara and Shayeghi 2012). According to World Health Organization (WHO) worldwide obesity has nearly tripled since 1975 and the number of people diabetes has risen from 108 million in 1980 to 422 million in 2014. Diabetes or Diabetes Mellitus comprises three major diagnoses: the most common of which is Type 2 diabetes, then Type 1 diabetes and finally, gestational diabetes which is temporary occurring during pregnancy (American diabete association 2010). Type 1 diabetes is characterized as an autoimmune disease marked by insulin hyposecretion thus causing an increase in blood glucose content, resulting in metabolic damage. On

the other hand, patients with Type 2 diabetes are unable to produce enough insulin or are not able to use their endogenous insulin effectively (American diabetes association 2010). The severity of diabetes is linked to the development of chronic complications, which may affect many organs including the kidneys, the cardiovascular system, vision and neuropathies of the extremities (Forbes and Cooper 2013). Diabetes can induce hyperglycaemia and dyslipidaemia and thus, contributes to cardiovascular diseases and thereby high rates of mortality and morbidity (Thomas and Foody 2007). Current treatments for Type 2 diabetes comprise long-term drug intake which are accompanied by unpleasant side effects such as nausea and vomiting (Meier 2012). There are different treatments for Type 1 diabetes (Atkinson and Eisenbarth 2001) and Type 2 diabetes (Olokoba, Obateru and Olokoba 2012; Kahn, Cooper and Del Prado 2014). The most common treatment is the injection/inhalation of insulin that inhibits glucose production through gluconeogenesis and stimulates glucose uptake and lipid synthesis (Sonksen and Soksen 2000; Edgerton et al. 2017). Another treatment is the use of α -glucosidase and α -amylase inhibitors to delay digestion of carbohydrates and thereby the release of glucose into the circulation (Lee et al. 2010; Hwang, Hung, Tsai, Chien and Kong 2015). Inhibiting the activity of these two enzymes can control postprandial hyperglycemia, and reduce the risk of diabetic complications (Abirami et al. 2018). The third treatment method comprises

aldose reductase inhibitors which have a considerable therapeutic potential since they prevent the transformation of glucose into sorbitol (as part of the polyol pathway of glucose metabolism), which is responsible for diabetic complications (eye and nerve damage) (Wang et al. 2005). Additionally, the improvement of dyslipidaemia is one of the key protective activities of treatments to reduce cardiovascular disease risk as a co-morbidity of diabetes (Thompson 2004; Hunter and Hegele 2017).

Gupta and Abu-Ghannam (2011a), Murray et al. (2018b) and Murray, Dordevic, Bohnam and Ryan (2018c) reviewed studies evaluating phenolic extracts from *Alaria esculenta*, *Ecklonia cava*, *E. stolonifera*, *Ishige okamurae*, *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum* which showed anti-hyperglycaemic effects. Yuan et al. (2018) validated this activity with extracts from *A. nodosum*, *Saccharina japonica*, *Lessonia trabeculata* and *L. nigrescens* showing inhibition of enzymes involved in diabetes, i.e. α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase. Phlorotannins isolated from *Ishige okamurae* (diphlorethohydroxycarmalol), *Eisenia bicyclis* (phlorofucofuroeckol A, dieckol, 8,8'-bieckol), *Ecklonia cava* (dieckol) showed the same enzymatic inhibitory activities (Murray et al. 2018b;c). Antihyperlipidaemic effects have also been reported for phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* (dieckol), *E. stolonifera* (phloroglucinol, eckol, dieckol, dioxinodehydroeckol, phlorofucofuroeckol A)

(Murray et al. 2018c). Phlorotannins are therefore potential anti-hyperlipidaemic agents in humans, but differences have been observed between humans and animal models associated with bioavailability and dosing of these potential bioactive agents (Murray et al. 2018b).

Bromophenols from red algae have also strong potential in the treatment of diabetes: for example, five bromophenols (2,2',3,6,6'-pentabromo-3',4,4',5-tetrahydroxydibenzyl ether, bis(2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxyphenyl)methane, 2,2',3,5',6-pentabromo-3',4,4',5-tetrahydroxydiphenylmethane, 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxymethylbenzene and 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzaldehyde) from *Symphyocladia latiuscula* exhibited significant aldose reductase inhibitory activities (Wang et al. 2005); one bromophenol (bis(2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether) purified and identified from *Polyopes lancifolius* was an α -glucosidase inhibitor (Kim, Nguyen, Kurihara and Kim 2010); and four bromophenol derivatives (2,2',3,3'-tetrabromo-4,4',5,5'-tetrahydroxydiphenylmethane, 3-bromo-4,5-bis(2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl)pyrocatechol, bis(2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether and 2,2',3-tribromo-3',4,4',5-tetrahydroxy-6'-ethyloxymethyldiphenylmethane) from *Rhodomela confervoides* (Shi et al. 2008) exhibited significant inhibitory activities against the protein

tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), a protein that regulates the insulin signaling pathway. A crude ethanol extract from the green macroalga *Ulva rigida* also reduced plasma glucose levels in rats (Celikler et al. 2009). In their review on the anti-obesity potential of marine organisms, Lauritano and Ianora (2016) discussed that marine algae are potential therapeutical agents for the treatment of Type 1 and Type 2 diabetes. Microalgae and Cyanobacteria have been identified as promising candidates to potentially reduce the risk of diabetes and cardiovascular diseases (De Jesus Raposo and De Morais 2015; Lauritano and Ianora 2016) with their phenolic compounds thought to play a role in these effects (Aboulthana, El-Feky, Ibahim, Sahu and El-Sayed 2018). On the other hand, Sun et al. (2010) identified algal carotenoids and unsaturated fatty acids as the main contributors to their strong antiglycative capacities that inhibit the formation of advanced glycation endproducts (AGEs) such as methylglyoxal and similar aldehydes, and not phenolics.

Hypertension is one of the most important independent risk factors for cardiovascular diseases (World Health Organization, & International Society of Hypertension Writing Group 2003). One way to treat hypertension is the use of an Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitor (Ondetti and Cushman 1982). Indeed, ACE is a proteinase which catalyzes the conversion of angiotensin I to angiotensin II, the latter being a potent vasoconstrictor involved in the

pathogenesis of hypertension (Ondetti and Cushman 1982). Thus, limiting its action reduces the risk of hypertension (Ondetti and Cushman 1982). The ability to exert antioxidant activities can also suggest antihypertensive activity due to the fact that great concentration of oxidant molecules such as reactive oxygen species (ROS) causes cell damage and induce the progression of atherosclerosis (Gómez-Guzmán et al. 2018). Some ethanol extracts from *Fucus spiralis*, or phlorotannins such as phlorofucofuroeckol A, dieckol, eckol from *Ecklonia cava* and *E. stolonifera*, showed great inhibitory activities against ACE (Jung, Hyun, Kim and Choi 2006; Gómez-Guzmán et al. 2018). Nevertheless, only limited *in vivo* experiments have confirmed these activities (reviewed in Gómez-Guzmán et al. 2018). Some red algae have also been reported to exhibit a strong ACE inhibitory activity, such as a phenolic-rich ethanolic extracts of *Gelidium amansii* which exhibited 50% ACE inhibition (Jung et al. 2006), *Fushitsunagia catenata*, or *Ahnfeltiopsis flabelliformis* with an ACE inhibition greater than 90% (Cha, Lee and Jeon 2006). For green seaweeds, Taboada, Millán and Míguez (2010) reported that *Ulva* species are better suited for diets directed to reduce the LDL-cholesterol plasma, and that its consumption decreased the risk of cardiovascular diseases in rodents.

Anti-proliferative and anti-cancer properties

The challenges in curing many chronic diseases, such as the many forms of cancer, as well as the

cytotoxicity and unpleasant side-effects of many chemotherapeutic drugs has stimulated research into the development of new drugs from natural sources (Rocha, Seca and Pinto 2018). A large variety of seaweed extracts, particularly those enriched in phenolic compounds and also some isolated phlorotannins, have been reported to exhibit cytotoxic activities against a variety of tumoral cells *in vitro* (Rocha et al. 2018). Phenolic compounds have been reported as being potentially promising in the treatment of lymphoma and leukemia; for example, Zubia et al. (2009) demonstrated cytotoxic activities of crude extracts from *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira tamariscifolia*, *Desmarestia ligulata*, *Dictyota dichotoma* and *Halidrys siliquosa* against Daudi cell line (Burkitt's lymphoma), as well as against Jurkat and K562 cells (human leukemia). An ethyl acetate extract of *Sargassum fusiforme* induced apoptosis in human leukemia U937 cells and an extract enriched in phlorotannins from *Saccharina japonica* exhibited anti-proliferative activity in a murine leukemic cell line (P388) (in Zubia et al. 2009). Moreover, a merosesquiterpene isolated from *Dictyopteris* sp., chromazonarol, exhibited anti-proliferative activities against P388 leukemia cells (Barrero, Alvarez-Manzaneda, Herrador, Chahboun and Galera 1999). For green algae, Harada and Kamei (1998) reported that low molecular weight polar compounds extracted from *Cladophoropsis vaucheriaeformis* exhibited anti-proliferative activities against murine leukemia L1210 cells.

Many studies have also demonstrated that phenolic compounds could be antiproliferative against colorectal cancer; for example, chloroform, ethyl acetate and methanol fractions of *Cystoseira compressa* exhibited antiproliferative activities against the colon carcinoma cell line HCT15 (Mhadhebi et al. 2012); a phenolic-rich extract from the red macroalga *Palmaria palmata* inhibited the proliferation of Caco-2 human colon cancer cells (Nwosu et al. 2011); and an enzymatic extract from *Ecklonia cava* obtained with an exol, 4 alpha-D-glucosidase, enriched in phlorotannins, inhibited cell proliferation of a murine colon cancer cell line (CT-26) (Athukorala, Kim and Jeon 2006). An ethanolic extract from *Sargassum fusiforme* induced apoptosis in cancer cells via up-regulating tumor necrosis factor- α (TNF- α) expression and also reduced pre-neoplastic lesions in the colon which progress into colorectal cancers in F344 male rats (Son et al. 2018). Ryu et al. (2013) also demonstrated the cytotoxic effects of a hydroethanolic extract from the green alga *Ulva fasciata* on HCT 116 colon cancer cells, by activating apoptotic enzymes such as the caspase family. An isolated dibrominated phenolic compound from the red alga *Polysiphonia lanosa* exhibited high cytotoxic activity against human colon adeno-carcinoma DLD-1 cells (Shoeib et al. 2004) and the chromazonarol, a merosesquiterpene from *Dictyopteris* sp., exhibited antiproliferative activities against HT-29 colon cancer cells (Barrero et al. 1999).

From a general point of view, phloroglucinol-based polyphenols isolated from brown marine seaweeds, with a focus on *Ecklonia cava*, have exhibited antioxidant activities acting as chemopreventive agents against breast cancer cells and are reviewed by Pádua, Rocha, Gargiulo and Ramos (2015). According to Imbs and Zvyagintseva (2018), phloroglucinol suppressed the metastatic ability of breast-cancer cells. A methanol:ethyl acetate extract of *Sargassum angustifolium* (Vaseghi, Sharifi, Dana, Ghasemi and Yegdaneh 2018), and chloroform, ethyl acetate or methanol fractions of *Cystoseira compressa* enriched in phenolic compounds (Mhadhebi et al. 2012) exhibited antiproliferative activities against MCF7 breast cancer cells. The phlorotannins (dioxinodehydroeckol, 1-(3',5'-dihydroxyphenoxy)-7-(2'',4'',6-trihydroxyphenoxy)-2,4,9-trihydroxydibenzo-1,4-dioxin) from *E. cava* also exhibited antiproliferative effect on MCF-7 cells (Kong, Kim, Yoon and Kim 2009; Thomas and Kim 2011).

A phenolic-rich aqueous-methanol soluble extract from *Palmaria palmata* at concentrations between 0.5-5.0 mg/mL in culture (Yuan, Carrington and Walsh 2005) and fractions from *Sargassum angustifolium* (Vaseghi et al. 2018) inhibited the proliferation of HeLa cervical cancer cells. A bromophenol isolated from *Rhodomela confervoides* (3-bromo-4,5-dihydroxy benzoic acid methyl ester) exhibited anti-proliferative activities against three tumor cell lines with the highest

activity against human epithelial tumor cell KB, a subline of the HeLa cell line (Lijun, Nianjun, Jiangong, Xiaojun and Chengkui 2005). Furthermore, phlorotannins from *Saccharina japonica* exhibited anti-proliferative activities against BEL-7402 human hepatocellular carcinoma cells (cited in Zubia et al. 2009). Mancini-Filho et al. (2009) demonstrated that Free Phenolic Acids (FPA), i.e. salicylic, cinnamic, gallic, and caffeic acids, extracted from *Halimeda monile* could modulate the antioxidant enzymes and decreased oxidative status in the liver of rats, treated daily for 20 days with FPA (at different concentrations) incorporated within the food diet of animals. With their *in vivo* experiment with rats with induced hepatic injury, authors showed thereby that FPA protect the expression of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), essential hepatic enzymes, in rats under experimental CCl₄-induced cirrhosis injury (Mancini-Filho et al. 2009).

A phlorotannin-rich extract of *Cystoseira compressa* exhibited antiproliferative activities against the A549 pulmonary adenocarcinoma cell line (Mhadhebi et al. 2012) and purified fractions of *Sargassum oligocystum* exhibited antiproliferative activities against the GLC4-Adr human lung carcinoma cell line resistant to adriamycin, a powerful anti-cancer drug (Praiboon, Palakas, Noiraksa and Miyashita 2018). Chromazonarol, a merosesquiterpene isolated from *Dictyopteris* sp., exhibited anti-proliferative activities against P549 lung cancer cells (Barrero et al. 1999). Finally,

Pereira et al. (2011) tested the anti-proliferative activity of six meroditerpenoids, tested at different concentrations, from 6.25 to 25 µM or 12.5 to 50 µM depending of the isolated compound, from *Styopodium flabelliforme* against different cell lines: human (Caco-2 and SH-SY5Y), non-human cancer lines (RBL-2H3 and RAW.267) together with non-cancer cells (V79). Authors demonstrated that three meroditerpenoids, i.e. epitaondiol, epitaondiol monoacetate and stypotriol triacetate, were efficient against the human neuroblastoma (SH-SY5Y; nearby 100% of inhibition of cell proliferation); this cell-line representing the most susceptible cell-line.

Antimicrobial and anti-parasite properties

Increasing resistance of clinically important bacteria against current antibiotics is a major problem worldwide (Neu 1992). For example, *Staphylococcus aureus*, a pathogen responsible for life-threatening infections including bacteremia, endocarditis, osteomyelitis and pneumonia, is resistant to methicillin and is thus, often referred to as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) or other current beta-lactam antibiotics from the penicillin family (Neu 1992). Thus, there is a great interest in identifying novel natural antibiotics. In this sense, macroalgal polyphenols may be promising molecules with antimicrobial properties (Bennamara et al. 1999; Sandsdalen, Haug, Stenvag and Styrvold 2003; Choi et al. 2010; Pereira et al. 2011; Eom, Kim and Kim 2012; Eom et al. 2013; Kim et al. 2018), from untapped sources,

compared to terrestrial plants (Ríos and Recio 2005 as a review). Several methods are used to assess the antimicrobial activities of algal extracts including *in vitro* assays such as diffusion agar tests, growth inhibition assay, minimum inhibitory concentration determination or *in vivo* assays such as test on shrimp or fish feed which were less numerous (reviewed by Pérez, Falqué and Domínguez 2016), with methanol identified as the best extractive solvent for active constituents (Cox et al. 2010; Jaswir, Tope, Raus, Monsur and Ramli 2014; Moubayed, Al Hour, Al Khulaifi and Al Farraj 2017).

Eight phlorotannins (i.e. phloroglucinol, eckol, fucofuroeckol-A, phlorofucofuroeckol-A or PFF, dioxinodehydroeckol, 8,8'-bioeckol, 7-phloroekol and dieckol) isolated from *Eisenia bicyclis*, *Ecklonia cava*, *E. kurome* and *E. stolonifera*, exhibited antimicrobial activities against food-borne pathogenic bacteria (*Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*), antibiotic resistant bacteria (MRSA) and foot fungus (*Tinera pedis*) (reviewed by Eom et al. 2012). Eom et al. (2013) confirmed the antibacterial activities against MRSA by six phlorotannins isolated from *Eisenia bicyclis* (eckol, fucofuroeckol A, 7-phloroekol, dioxinodehydroeckol, PFF and dieckol). According to Kim et al. (2018), three phlorotannins (fucofuroeckol-A, PFF and dioxinodehydroeckol) exhibited strong inhibition against *Listeria monocytogenes*, the food borne pathogen

responsible for listeriosis. Fucophlorethol from *Fucus vesiculosus* also exhibited antibacterial effects against *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermis*, *S. aureus* and *Escherichia coli* (Sandsdalen et al. 2003). A meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*, methoxybifurcarenone, exhibited antibacterial activities against *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens* (Bennamara et al. 1999). Pereira et al. (2011) reported that meroditerpenoids from *Styopodium flabelliforme*, i.e. epitaondiol monoacetate, stypotriol triacetate and stypodiol, exhibited antibacterial activities against *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis* and *Salmonella typhimurium*. The Cyanobacteria *Leptolyngbya crossbyana* was reported to contain crossbyanols, which are brominated and sulfated polyphenyl ethers, which exhibited antibacterial activity especially against MRSA (Choi et al. 2010).

In the skincare or dermatology sector, acne or acne vulgaris is a common skin disease or condition affecting adolescents and adults which is a complex and multifactorial skin pathogenesis (Tan, Vasey and Fung 2001). *Staphylococcus epidermis*, *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are often responsible for acne conditions (Wang, Li, Lee and Chang 2017). These authors reported that an ethyl acetate fraction from *Fucus evanescens* exhibited strong antibacterial activity against *Propionibacterium acnes*, often present in acne vulgaris, and also against MRSA. Lee et al. (2014)

also reported that fucofuroeckol-A inhibited acne-related bacteria (*Propionibacterium acnes*). Kok, Jee, Chew and Wong (2016) studied a methanol fraction of *Sargassum polycystum* and reported an *in vitro* inhibitory activity against *P. acnes*.

Interest in antifungal activities of phenolic compounds has also been demonstrated; for example, extracts from brown macroalgae *Cystoseira sedoides*, *C. crinita* and *Dictyopteris membranacea* exhibited antifungal activities against yeast *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* and *C. kefyr* (Mhadhebi et al. 2012). Purified phlorotannins from *Cystoseira nodicaulis*, *C. usneoides* and *Fucus spiralis* exhibited fungistatic and fungicidal activities against *Candida albicans* and dermatophytes, i.e. *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, (Lopes, Pinto, Andrade and Valentão 2013). Kim et al. (2018) reported antifungal activity against *C. albicans* due to fucofuroeckol-A isolated from *Eisenia bicyclis*. A meroditerpenoid from *Cystoseira tamariscifolia*, methoxybifurcarenone, also exhibited antifungal activities but against different species, which included tomato pathogenic fungi, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and *Verticillium alboatrum* (Bennamara et al. 1999).

Bromophenols from red algae have also been reported to exhibit antimicrobial and antifungal activities; for example, Barreto and Meyer (2006) reported that lanosol derivatives, a bromophenol common in the Rhodomelaceae, have antimicrobial activity against various terrestrial and

marine bacteria together with fungi. The bromophenol 3-bromo-4,5-dihydroxybenzaldehyde isolated from *Rhodomela confervoides* demonstrated antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (Lijun et al. 2005). Some bromophenols, 2,5-dibromo-3,4-dihydroxy-6-(2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl)benzyl methyl ether and 2,2',3,3'-tetrabromo-4,4',5,5'-tetrahydroxydiphenylmethane, isolated from respectively *Symphyclocladia latiuscula* (Xu, Yin, Gao, Gao and Song 2014) and *Odonthalia corymbifera* (Oh et al. 2008) were reported to exhibit antifungal activities against the pathogenic yeast *Candida albicans*. Some bromophenols isolated from *Callophycus serratus* (Lane et al. 2009; Paige-Stout et al. 2010) have been reported to exhibit anti-malaria properties due to their macrolide structure.

Antiviral activities

Viral diseases are caused by infectious agents that enter the cells of organisms to reproduce (Koonin and Starokadomskyy 2016). They may then go on to cause illnesses or diseases, which can be more or less severe, ranging from a common cold due to rhinovirus to the human immunodeficiency virus (HIV) giving rise to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) (Moir, Chun and Fauci 2011). Viral diseases may be transmitted from one individual to another through aerosol droplets or saliva (influenza virus), unprotected sexual intercourse

(herpes simplex virus HSV and human papillomavirus HPV), or vectors such as mosquitoes and animals (dengue, chikungunya, ebola or rabies virus) (Koonin and Starokadomskyy 2016). In some cases, viral diseases can be highly contagious leading to outbreaks, epidemics or even pandemics.

HIV, which is responsible for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), is one of the most studied viruses to date (Moir et al. 2011). The exploration for potential drug treatments has increased the development of new generation anti-HIV therapeutics (Flexner 2007). Thus, phlorotannins 6,6'-bioeckol, 8,8'-bieckol and 8,4''-dieckol from *Ecklonia cava* may be potential inhibitory substances for HIV type 1 (HIV-1) infections (Thomas and Kim 2011). Karadeniz, Kang, Park, Park and Kim (2014a) validated 8,4''-dieckol as a potential candidate for inhibition of HIV-1 with especially an inhibition of the HIV-1 reverse transcriptase. A review by Karadeniz, Karagozlu and Kim (2015a) discussed the inhibitory activities of a phlorotannin, diphlorethohydroxycarmalol, isolated from *Ishige okamurae* against HIV-1. This Phaeophyta species is also a potential source of antivirals against influenza A virus, due to the production of phlorofucofuroeckol (Ryu et al. 2011). Soares et al. (2007) reported that while 3 meroditerpenoids from *Styopodium zonale* did not inhibit the transcriptase reverse enzyme of HIV-1, but they

may act on other phases of the virus replication cycle.

Genital human papillomavirus (HPV) infection is the most common sexually transmitted infection and may lead to cervical cancer (Muñoz, Castellsagué, de González and Gissmann 2006). Eckol, dieckol, 8-8'-bieckol, 6-6'-bioeckol and phlorofucofuroeckol-A (PFF-A), isolated from *Eisenia bicyclis*, exhibited reductions of HPV strains HPV16PV and HPV18PV *in vitro* (Kim and Kwak 2015). Dieckol and PFF-A also exhibited antiviral activities against murine norovirus which was responsible for epidemics with symptoms including vomiting, diarrhea, mild fever, abdominal cramping and nausea (Eom et al. 2015).

Human metapneumovirus (HMPV) is an important agent of severe upper respiratory infections (Mazzoncini, Crowell, and Kang 2010). Mendes et al. (2011) reported that the meroditerpenoids epitaondiol and atomaric acid isolated from *Styopodium zonale* inhibited more than 90% of *in vitro* HMPV replication. These two meroditerpenoids and peroxy lactone of 5'-desmethyl-5'-acetyl atomaric acid extracted from this same species inhibited HSV type 1 (HSV-1) replication (Soares et al. 2007).

Mineralogenic and osteogenic activities

The formation and remodeling of bone tissue is regulated by the osteoblast cells that form bone tissue and the osteoclasts which resorb it (Raisz 2001). In some individuals, male or female, aging and numerous pathological processes such as

osteoporosis induce a decrease in the bone formation and an increase in bone resorption leading to osteoporosis, which is characterized by a decrease in bone mass (Riggs, Khosla and Melton 1998; Habauzit and Horcajada 2007; Yamaguchi 2013). Osteoporosis is widely recognized as a major public health concern worldwide particularly, as populations advance in age (Johnell and Kanis 2006; Hernlund et al. 2013; Yamaguchi 2013). In osteoporosis, it has been shown that oxidative stress plays an important role (Wauquier, Leotoing, Coxam, Guicheux and Wittrant 2009); for example, Arai, Shibata, Pudjee, Abiko and Ogata (2007) reported that ROS may be responsible for the development of bone loss and that the activity of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), is a marker of oxidative stress in menopausal women. Several studies have demonstrated that natural compounds with antioxidant activity, including green tea, vitamins, quinones and polyphenols may influence bone mineralization/remodeling (Karadeniz et al. 2015b; Córdoba et al. 2014; Córdoba, Monjo, Hierro-Oliva, González-Martín and Ramis 2015; Watson and Schönlaue 2015). In particular, polyphenols could be effective candidates for the prevention of osteoporosis by preventing bone loss through the inhibition of oxidative stress; more precisely, these compounds activated the proliferation and differentiation of osteoblasts in culture (Habauzit and Horcajada 2007; Woo, Yonezawa and Nagai 2010; Karadeniz, Kim, Ahn, Kwon and Kong 2014b; Karadeniz et al. 2015b).

Surget et al. (2016) demonstrated the efficacy of phenolic compounds including phenolic acids from two green seaweeds, *Codium fragile* and *Cladophora rupestris*, for *in vitro* pro-mineralogenic and *in vivo* pro-osteogenic properties. In their work, bone-derived teleost VSa13 cells exposed to purified phenolic fractions exhibited an increase in extracellular matrix (ECM) mineralization, potentially by promoting cell differentiation. This *in vitro* work was accompanied by an *in vivo* assay with developing zebrafish larvae (Laizé, Gavia and Cancela 2014). The mineralized area of the operculum, a dermal bone derived from neural crest cells, was increased in fish exposed to the purified phenolic fractions, at similar levels promoted by the positive control. Similar pro-mineralogenic effects were observed when human fetal lung fibroblast MRC-5 cells (Ryu, Li, Qian, Kim and Kim 2009) and human osteosarcoma MG-63 cells were treated with phlorotannins from the brown seaweed *Ecklonia cava* (Ryu et al. 2009; Yeo, Jung and Kim 2012). Ryu et al. (2009) identified two phlorotannins responsible for the pro-mineralogenic activity *in vitro*: dieckol and the 1-(3,5-dihydroxyphenoxy)-7-(2,4,6-trihydroxyphenoxy)-2,4,9-trihydroxydibenzo-1,4-dioxin.

With respect to bone building and tissue regeneration, studies have shown that phlorotannins could stimulate the differentiation of osteoblasts by enhanced alkaline phosphatase (ALP) activity, collagen and mineralization in the

non-cytotoxic concentration range, which makes them interesting for applications related to bone regeneration (Córdoba et al. 2014; 2015; Watson and Schönlau 2015). In particular, phlorotannins from *Ecklonia cava* increased ALP activity, mineralization, total protein, and collagen synthesis in human osteosarcoma cells (MG-63 cells) (Ryu et al. 2009; Ali and Hasan 2012; Yeo et al. 2012; Karadeniz et al. 2015b), suggesting that they may act as regulators of osteoblast differentiation and bone formation. Additionally, Yoon et al. (2013) demonstrated that the meroditerpene sargachromanol D, isolated from the brown macroalga *Sargassum siliquastrum*, inhibited production of inflammatory cytokines, which play a major role in osteoclastogenesis, leading to the bone resorption frequently associated with osteoporosis. Sargachromanol D acted as an inhibitor of osteoclast formation and could be an alternative nutraceutical or treatment in the prevention or reducing osteolysis or osteoporosis (Yoon et al. 2013). Other biological activities, anti-inflammatory and anti-carcinogenic activities, were observed for this meroditerpene extracted from Sargassaceae species (Birringer, Siems, Maxones, Frank and Lorkowski 2018). Nevertheless, the non-cytotoxicity of these compounds to tissues/cells/organisms is vital for the recommended use of such compounds in humans.

Photoprotective properties

Exposure to ultraviolet (UV) radiation from sunlight, in particular the UVB (280-320 nm) and UVA (320-400 nm) wavelengths, can be damaging to the skin causing sun burn, photoaging or even skin cancer due to skin cell DNA damage (Parrish, Jaenicke and Anderson 1982; Brash et al. 1991). To reduce exposure to and penetration of UV radiation, sunscreens or sunblocking agents are recommended to be applied on the skin (Singh and Kumar 2018). While synthetic photoprotective molecules such as para-aminobenzoic acid (PABA) can be found on the current market, the discovery and development of products containing natural sunscreen molecules is growing due to concerns about the harmful potential of the synthetics such as an increase of phototoxic/photoirritation or photoallergic responses and, longer-term, an increased risk of skin cancers or photoageing (Nash and Tanner 2014).

The most important consideration in the development of a new photoprotective product is safety. Brunt and Burgess (2017) and Pangestuti, Siahaan and Kim (2018) reviewed publications which showed that phlorotannins may be good candidates as photoprotective molecules. Indeed, the ethyl acetate fraction enriched in phlorotannins of *Halidrys siliquosa* appeared to be a broad-spectrum UV absorber (absorbing both UVB and UVA wavelengths) in *in vitro* assays with calculation of a Sun Protection Factor (Le Lann et al. 2016). In other work, protection against photo-

oxidative stress induced by UVB radiation was evaluated using assays including inhibition of tyrosinase and melanin synthesis, radical-scavenging properties on cell cultures, cell viability, DNA damage and *in vitro* microscopic analysis for dead cells (Heo et al. 2009). Phlorotannins isolated from *Ecklonia cava*, particularly dieckol, inhibited melanogenesis and reduced UVB radiation-induced cell damage. *In vivo* studies were also conducted with zebrafish embryos treated with phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* which showed a reduction in UVB damage (Ko et al. 2011; Cha, Ko, Kim and Jeon 2012).

On the other hand, as photosynthetic organisms are subjected to UV radiation and thereby damage themselves, accumulation of UV-absorbing compounds such as bromophenols or coumarins was reported in green algae, including *Ulva lactuca* (Flodin, Helidoniotis and Whitfield 1999), *U. pertusa* (Han and Han 2005), *Dasycladus vermicularis* (Pérez-Rodríguez et al. 2003), and *Prasiola stipitata* (Gröniger and Häder 2002). Moreover, scytonemin, a polyphenolic pigment, protects Cyanobacteria against UV-radiation (Garcia-Pichel and Castenholz 1991; Proteau et al. 1993). Thus, algal polyphenols may be useful as chemopreventive agents to reduce the risk of for UVB induced skin carcinogenesis (Hwang, Chen, Nines, Shin and Stoner 2006). Although only few *in vivo* tests have yet been conducted (Ko et al. 2011; Cha et al. 2012), cosmetic products have already

been developed from these molecules to protect the skin.

Biological properties specific to cosmetics or cosmeceuticals

- Anti-aging properties

Anti-aging skin care is a large and growing segment of the cosmetic and cosmeceutical markets, with an annual growth rate close to 10%, when the global skin care sector growth rate is less than 8% (Brandt, Cazzaniga and Hann 2011). Aging is a complex phenomenon involving intrinsic (genetic) and extrinsic causes, including exposure to sun or smoking (Ramos-e-Silva, Celem, Ramos-e-Silva and Fucci-da-Costa 2013). One visible effect of aging is the appearance of wrinkles due to changes in skin thickness and elasticity of fibers (Sanjeewa et al. 2016). According to Couteau and Coiffard (2016), there are three types of wrinkle: crinkles, non-permanent wrinkles linked to the degradation of the elastic fibers of the dermis; glyphic wrinkles, which are permanent and accentuate the cutaneous micro-relief; and facial linear wrinkles, which are permanent wrinkles corresponding to expression lines. Different mechanisms can be used to fight wrinkles: stimulating collagen and hyaluronic acid synthesis, or inhibition of matrix metalloproteinase (collagenase), elastase or hyaluronidase (Ramos-e-Silva et al. 2013). Thus, extracts from macroalgae could be tested to determine their efficacy in inhibition of enzymes implicated in the aging process.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are endopeptidases able to degrade extracellular matrix proteins which form the skin matrix and are responsible for the firmness, strength and elasticity of the skin (Ramos-e-Silva et al. 2013); with aging, MMP levels are reported to decrease. Isolated phlorotannins (eckol, dieckol) from *Eisenia bicyclis* and *Ecklonia kurome*, *E. stolonifera* and *E. cava* exhibited MMP-1 (collagenase), MMP-2 (gelatinase) or MMP-9 (gelatinase) inhibition in cell models (Joe et al. 2006; Kim et al. 2006). Riani, Anwar and Nurhayati (2018) demonstrated an anti-collagenase activity of a *Sargassum plagiophyllum* extract *in vitro*.

Hyaluronidase is an enzyme responsible for the depolymerization of hyaluronic acid, an important polysaccharide present in the extracellular matrix of the skin and responsible for water retention and tissue regeneration (Meyer 1947). This enzyme is also involved in allergenic effects (see paragraph on anti-allergy properties above). In the review of Sanjeeva et al. (2016), hyaluronidase inhibition was observed with phlorotannins isolated from *Fucus spiralis*, *Cystoseira nodicaulis*, *C. usneoides* and *C. tamariscifolia* (Ferrerres et al. 2012) and also from *Eisenia kurome* and *E. bicyclis* (Shibata, Fujimoto, Nagayama, Yamaguchi and Nakamura 2002). Shibata et al. (2002) hypothesized that the structure of the phlorotannins has an important role because acetylation of the phenolic hydroxyl group reduced the inhibitory effect. Fayad et al. (2017) reported similar anti-hyaluronidase

activities between that observed with an *Eisenia bicyclis* phlorotannin fraction and by an extract from *Padina pavonica* using capillary electrophoresis-based enzymatic assays.

Elastase is a proteinase enzyme capable of degrading elastin, which is an important extracellular matrix protein providing elasticity of the skin (Tsuji, Moriwaki, Suzuki, Takema and Imokawa 2001). According to Puspita et al. (2017), an enriched phenolic compounds fraction of *Sargassum muticum*, extracted using different commercial enzymes, exhibited elastase inhibition activities with *in vitro* assay. Tyrosinase is a metalloenzyme oxidase which catalyze melanin synthesis (Solano, Briganti, Picardo and Ghanem 2006). Molecules that inhibit this enzyme are potential candidates for anti-wrinkle applications but also for whitening skin (e.g. Lin, Chiang, Lin and Wen 2008; Sanjeeva et al. 2016) (see below).

- Whitening properties

With aging and chronic UV exposure, hyperpigmentation is unavoidable with the emergence of brown melanin pigmentation patches or spots on the skin (Gilchrest, Blog and Szabo 1979). Depigmenting or whitening/lightening molecules such as arbutin (hydroquinone-O-beta-D-glucopyranoside) and derivatives, kojic acid and derivatives and flavonoids have been investigated to remove those localized brown patches as skin whitening/lightening is a common practice, particularly in Asia (Lin et al. 2008; Sanjeeva et al.

2016). Tyrosinase has a key role in pigmentation as this enzyme catalyzes melanin synthesis in melanocytes with conversion of L-tyrosine to dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), followed by the oxidation of L-DOPA to dopaquinone with polymerization to finally yield melanin (Slominski, Tobin, Shibahara and Wortsman 2004; Lin et al. 2008). Consequently, tyrosinase inhibitors have been explored for their anti-pigmentation properties and as potential agents to reduce brown patches (Solano et al. 2006; Lin et al. 2008).

The most common method to evaluate tyrosinase inhibition is spectrophotometrically using mushroom tyrosinase (see references in Sanjeewa et al. 2016). Several studies using crude extracts of brown seaweeds containing phlorotannins have shown tyrosinase inhibition *in vitro* using the mushroom enzyme test: an acetone extract of *A. nodosum* (Jiménez, O'Connell, Lyons, Bradley and Hall 2010), a methanolic extract of *Ecklonia stolonifera* (Kang et al. 2004), ethanolic extracts of *Ecklonia cava* and *Sargassum siliquastrum* (Yoon, Eom, Kim and Kim 2009). However, opposite outcomes have also been reported, as with an ethanolic extract of *Sargassum polycystum* which did not inhibit tyrosinase activity in the mushroom enzyme assay (Chan, Kim and Cheah 2011). In the crude extracts above, the inhibitory activities were linked to phenolic compounds, but other molecules likely existed in the crude extracts as well. An ethyl acetate fraction from *E. cava*, rich in phenolics,

exhibited close to 80 % tyrosinase inhibition at 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Yoon et al. 2009).

Isolated phlorotannins have also been reported to inhibit tyrosinase activity when using the *in vitro* mushroom enzyme-based assay; for example, Heo et al. (2009) reported tyrosinase inhibition, by phlorotannins isolated from *E. cava*, with dieckol having the greatest effect on tyrosinase, compared to the positive control kojic acid, phloroglucinol and eckol. Dioxinodehydroeckol and 7-phloroeckol purified from the same algal species have also been reported to inhibit tyrosinase (Yoon et al. 2009). Moreover, phloroglucinol and 7-phloroeckol were identified as non-competitive tyrosinase inhibitors (Yoon et al. 2009). Similarly, Kang et al. (2004) reported the tyrosinase inhibitory activity of isolated phlorotannins from *E. stolonifera* with the greatest efficacies for dieckol followed by eckol, phloroglucinol, eckstolonol and phlorofucofuroeckol A. These authors also demonstrated that eckol, phlorofucofuroeckol A and dieckol were non-competitive inhibitors for the oxidation of the substrate catalyzed by tyrosinase, while phloroglucinol and eckstolonol were competitive inhibitors.

- Hair growth properties

A review paper by Sanjeewa et al. (2016) discussed how dieckol and 7-phloroeckol from *E. cava* induced hair growth with a proliferation of dermal papilla cells (which play a critical role in regulating hair follicle development and regeneration) and an inhibition of 5 α -reductase enzyme activity (a

marker for hair loss prevention). Shin et al. (2016) reported similar effects in *ex vivo* human hair follicle cultures treated with enriched phenolic compounds fraction or purified phenolic compounds isolated from *E. cava* (dieckol, phlorofurofucoeckol A), but found no activity with the purified compounds. These authors discussed that the effects of phenolic compounds varied depending on cell type and test conditions such as *in vitro*, *in vivo* or *ex vivo* as expected (Shin et al. 2016). Moreover, a combination of several phlorotannins might be more effective than a single molecule.

Potential commercial applications

Due to their large range of biological activities as discussed above, algal phenolic compounds are potential candidates for many industrial applications such as functional foods and nutraceuticals, pharmaceuticals, and functional cosmetic or cosmeceuticals (Plaza, Cifuentes and Ibañez 2008).

Interests for health and nutraceutical ingredients

Although the commercial use of seaweeds for their antioxidant properties remains in its infancy (Cornish and Garbary 2010), epidemiological data as well as accumulating evidence suggest that algal phenolic compounds may influence several health parameters or risk factors of diet-related chronic diseases: glycaemic control, lipid or inflammation levels, antimicrobial inhibition, cardiovascular disorder, proliferation of cancer as discussed above.

Some products are already on the market for different aspects of health. For example, Seanol® (Botamedi Inc, Korea) is a phlorotannin extract from *Ecklonia cava*, which is included in the composition of supplements to provide antioxidant protection. It is also available as a hydrogel application to enhance mineralization and regeneration of bone and antibacterial agents to reduce the risk of infection (Douglas et al. 2016). HealSea™ (Diana Naturals, France), is an extract from *Fucus vesiculosus* sold for cardiovascular health purposes (cited in Stiger-Pouvreau and Guérard 2018).

Several patents exist demonstrating different potential applications of phlorotannins in health; for example, antibiotic preparations included phlorotannins derived from *Eisenia bicyclis* (Kim, Kim, Lee and Eom 2012) or *Ecklonia* species (Ginnaga et al. 2002). Phlorotannins from *Ecklonia cava* have also been used in a preparation to prevent influenza (Cho 2016). Phlorotannins from both *E. stolonifera* and *E. cava* were included in a preparation for hepatoprotection related to alcoholic hepatic damage (Kim 2011). The antidiabetic activity of a commercial extract of *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum* (InSea²™, INNOVACTIV, Canada; innovactiv.com) has been reported in a human trial. More precisely, after the ingestion of 250 mg of InSea²™, 30 min before a consumption of 50 g of carbohydrates, authors demonstrated a reduction of 12% in the insulin content and InSea²™ was also responsible of

an increase in almost 8% of the insulin sensitivity of patients (Catarino et al. 2018).

Several studies have highlighted the potential therapeutic use of algal natural antioxidants, as dietary supplements for bone diseases such as osteoporosis or as nanocoatings to functionalize biomaterials, i.e. make a biomaterial functional, and improve current bone implants (Córdoba et al. 2014; 2015; Karadeniz et al. 2015b; Watson and Schönlaue 2015). Rao and Rao (2015) discussed a commercially available nutritional supplement, Greens+™, which contains polyphenols as a mixture of flavonoids from terrestrial plants in this work, but which are also found in some algae, combined with minerals, and vitamins which act to increase the antioxidant capacity of the preparation, and thereby potentially reduce oxidative stress associated with bone loss. These authors suggested that such a preparation could be a viable and efficient option to assist with bone formation.

Studies have reported the supplementation of bioceramic-based medical scaffolds with phenolic compounds such as phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava* with an aim to increase bone tissue regeneration or increase bone density (Yeo et al. 2012; Córdoba et al. 2014; 2015; Watson and Schönlaue 2015). Purified polyphenolic extracts that exhibit multiple biological activities without cytotoxicity could play a role in reducing cellular oxidative stress and thereby potentially promote bone mineralization (Yeo et al. 2012; Córdoba et al.

2015; Surget et al. 2017). These natural compounds have potential application in nutraceuticals or functional foods in the prevention of bone loss but also in medicine, to complement existing treatments of osteoporosis (Wauquier et al. 2009; Rao and Rao 2015). Senthilkumar, Venkatesan and Kim (2014) discussed examples of marine-derived osteogenic compounds/molecules including algal phenolic compounds such as including symbioimine from the marine dinoflagellate *Symbiodinium* sp. that showed excellent clinical potential as discussed above.

Interests for cosmetics and cosmeceutical ingredients

Innovative active molecules are constantly being researched and developed in the cosmetics sector. To date, terrestrial organisms such as *Aloe vera* have been intensely valorized, but the demand for marine sources is increasing (Eshun and He 2004). Seaweeds are already widely valorized by the cosmetic industry with their applications widespread (reviewed in Couteau and Coiffard 2016; Stiger-Pouvreau and Guérard 2018); marine phenolic compounds are currently used in the cosmetic industry in moisturizers, sunscreens, antiwrinkle preparations, whitening agents or to replace synthetic preservatives with antimicrobial properties (see examples below).

Antioxidant ingredients would potentially provide protection against pro-oxidative reactions in or on human skin but could also stabilize a cosmetic cream: for example, Balboa et al. (2014) reported

that phenolic-enriched extracts from *Sargassum muticum* incorporated into a skin cream, inhibited lipid oxidation in the cream during 34 days of storage. Another extract from the same seaweed was included in a sunscreen and enprotected against lipid oxidation with no variation in the cream color (Balboa, Conde, Constenla, Falqué-López and Domínguez 2017). Liu et al. (2018) described a facial cleansing formula containing a *S. muticum* extract and reported that glycerol and 1,2-propanediol extracts improved the stability of the emulsion and demonstrated a role for algal compounds in cosmetics. The inclusion of a methanol extract of *Ecklonia cava* in a Supersill® emulsion (a mix of cyclopentasiloxane, dimethicone and PEG-10 Dimethicone Crosspolymer; CNTEC Inc.) resulted in a stable emulsion with no change in appearance, color or odor over 4 weeks (Choi, Lee, Lee, Kim and Cho 2013). Currently, on the market, extracts of brown seaweed enriched in phlorotannins can already be found: for example, PHYACTYL® (Gelyma, France; www.gelyma.com), is a *Sargassum muticum* water extract which is purported to protect against free radicals, UV-radiation and provides skin detoxification (Pellegrini, André and Pellegrini 2003a). Another active algal extract from Gelyma (SEA HEATHER®) combines water extracts from *Cystoseira amentacea*, *C. caespitosa* and *C. brachycarpa* and is identified as protecting against oxidation, inflammation and DNA damage (Pellegrini, Pellegrini and André 2003b). Celtalga Extract (Spain; www.celtalga.com/es/algas-

industria-cosmetica) produces *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata* and *Sargassum muticum* ethanol extracts available for use by cosmetic companies, they advertise that these extracts exhibited antioxidant properties (Sineiro Torres, Sánchez Guerrero and Núñez García 2013).

Several skin lightening cosmetic ingredients rich in phlorotannins can already be found on the market such as LIGHTOCEANE® (Gelyma, France; www.gelyma.com) which is a skin lightener containing an extract from *Halidrys siliquosa* which decreased tyrosinase activity and melanin synthesis in water (Pellegrini and Pellegrini 2003). A patent describing the methodology to obtain an extract from *Agarum cribrosum* active against skin pigmentation has been filed in France and the patent has been expanded to the world (Paufique 2003). On the other hand, instead of whitening or lightening properties, BRONZ'ALG® (Gelyma, France; http://www.gelyma.com) was formulated to help maintain an even suntan; the product combines a *Bifurcaria bifurcata* aqueous extract with acetyl-tyrosine to up-regulate the major genes of the melanogenesis pathways as well as protect against free radicals and UV radiation (Pellegrini, Pellegrini and Villar 2016).

Anti-aging characteristics are amongst the most active research areas in the cosmetics industry, and extracts enriched in phlorotannins are currently found on the market for this purpose. One example is FIRM'ACT® (Gelyma, France; www.gelyma.com) which combines *Himanthalia elongata* and *Fucus*

vesiculosus extracts with a *Saccharomyces cerevisiae* extract to fight against genetic and environmental skin ageing risk factors. To protect against skin irritation and to moisturize the skin, EFFICIENSA® and SEAVIE® (Gelyma, France; <http://www.gelyma.com>) are products containing *Pelvetia canaliculata* and *Fucus serratus* extracts respectively (Pellegrini, Pellegrini and André 2003c). Another French company (SEPPIC, France; www.seppic.com) produces lipidic and water extracts enriched in phenolic compounds from the marine brown seaweed *Fucus vesiculosus* (OLEAPHYCOL FV and SUPERPHYCOL-D™BG PF, respectively).

Phenolic compounds from green algae are also used as ingredients in some cosmetic skincare products such as CODIAVELANE® BG PF (SEPPIC, France; www.seppic.com) which contains an active ingredient extracted from *Codium tomentosum* to be used for its long-lasting hydration. As this green macroalga is rich in polyphenolic antioxidants, the Italian company EME estetica produces an extract from the same algal species (PRO AGE SERUM; <http://www.eme-estetica.com>), extract which is used by the LOWE company, within its Kiemè cosmetic line (<http://lo-we.it/en/product-category/kieme/>), for its purported skin nourishing and moisturizing properties, and also to stimulate circulation, oxygenate the skin and counteract aging. An extract from another *Codium* species (*C. fragile*) is also used as a moisturizer and cell protector ingredient in MIRUAL® (Gelyma, France;

www.gelyma.com). The Spanish company Lipotec S.A.U. uses *Ulva lactuca* aqueous extracts (ACTIPHYTE™ sea lettuce; www.lipotec.com) for their radical scavenging and anti-inflammatory activities in cosmetic products.

Conclusion and future trends

Phenolics from marine algae form a class of diverse compounds, ranging from simple compounds such as phloroglucinol, coumaric acid, to more complex polyphenols such as phlorotannins, phenolic glycosides or meroterpenes as described before and illustrated in Figure 2. As a consequence of this wide variety of structures, phenolic compounds have numerous biological activities suggesting future prospects in the functional food and nutraceutical sectors to support health and well-being, as well as the cosmetic and cosmeceutical sectors. Among other biological activities phenolic compounds have been reported to act as antioxidant, anti-inflammatory, anti-diabetic, anti-microbial agents or in risk factor reduction for diet-related chronic diseases such as the development of some cancers. Algal polyphenols, are currently under-exploited compared to those from terrestrial plants, and thereby represent a promising resource because of the increased interest of industries in the use of natural ingredients to replace synthetic and controversial molecules. To date, much of the literature has been focused on brown algal phlorotannins, which have the highest levels of phenolic compounds. However, studying all algal phyla could lead to the

discovery of more bioactive phenolic compounds. Indeed, although microalgae, red or green macroalgae generally have lower levels of phenolic compounds, some can be very active even at small concentrations and could offer novel opportunities for industry. The occurrence of phenolic compounds in algae is extremely variable due to variations in a number of biotic, as grazing or pathogens infestation, and abiotic extrinsic factors like temperature, light, nutrients as examples. To valorize them at an industrial scale, it is therefore important to understand that environmental conditions can influence the production of phenolic compounds.

Furthermore, phenolic compounds are difficult to isolate due to their ability to complex with others molecules. Until now, the majority of studies focuses on the activities of crude extracts and more rarely on purified compounds. In recent years, new extraction techniques were thus developed to obtain active phenolic compounds, with an increased trend for green extractions that could help to enhance the value of polyphenols as bioactive compounds for dietary or human health. Phenolic compounds are often quantified by conventional colorimetric methods, taking into account all compounds with phenolic hydroxyl groups as a whole due to the difficulty of separating and isolating phenolics from other compounds. Consequently, the content of phenolic compounds is generally overestimated, as shown by Jégou, Kervarec, Cérantola, Bihannic and Stiger-Pouvreau

(2015) who used qNMR to better quantify phenolic content in *Cystoseira tamariscifolia*, a phloroglucinol-producing species. The development of new methods to quickly identify and quantify specific compound or some class of phenolic compounds in particular, is then necessary. In this sense, HPLC seems to be a good method, but it is not yet well developed due to the instability of phenolics and their ability to bond with others molecules (Stiger-Pouvreau et al. 2014), together with the lack of standards of different polymerization degrees.

Finally, even if some studies preconize to eat algae for their antioxidant capacities, more research is needed to evaluate the impact of an algal over-consumption (with the problem of iodine for the consumption of species that produce a large quantity of it) or the effect of isolated phenolic compounds after ingesting the alga. Indeed, a synergy between phenolic compounds and other molecules present in the alga may be observed, synergy that may be responsible for some activities measured *in vitro* on crude extracts but not found on isolated compounds. Conversely, an isolated phenolic compound with interesting activity may be, once ingested into the organism, no longer active or exhibit other unexpected undesirable activities. In this sense, most of the reported activities have been measured through *in vitro* tests, but *in vivo* approaches are needed to validate the potential of algal phenolic compounds for human health. However, it is mainly recognized

that algal-derived phenolic compounds play a major role as active ingredient for health and food products.

Acknowledgments

This review is part of the PhD thesis work carried out by the two first authors, LG and FL, within the Laboratory of Marine Environmental Science (LEMAR UMR 6539) set at the IUEM (UBO). They were supported by a grant from UBO and a research project RIV-AGE2.0 (financed by the

Brittany region, the Finistère Department and Brest metropole for LG, and from UBO and the Brittany Region for FL. Both PhD students contributed equally to this review, similar to their co-supervisors SC and VSP.

References

Because of a very large number of references for this review, see the bibliography at the end of the manuscript.

3 Le tissu industriel et intérêts des algues brunes

3.1 Quelques chiffres sur la production de macroalgues

3.1.1 Dans le monde et en Europe

Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO, 2018), la production mondiale de macroalgues s'élevait à plus de 30 millions de tonnes en 2016 : les pays asiatiques sont en tête avec la Chine (47,9%) et l'Indonésie (38,7%) suivis plus faiblement par les Philippines (4,7%), la Corée du Sud (4,5%), la Corée du Nord (1,6%) et le Japon (1,3%) ; le reste provient d'Amérique du Sud, d'Afrique et d'Europe. La Chine réalise son tonnage principalement avec la culture du kombu, *Saccharina japonica*. Le Japon a longtemps disposé de la laminaire sauvage en abondance mais suite à une demande croissante, leur culture a également été mise en place. Aujourd'hui, le principal moteur de la croissance de la production d'algues est la culture d'espèces tropicales *Kappaphycus alvarezii* et *Eucheuma* spp. en Indonésie (FAO, 2018) avec plus d'1,5 millions et plus de 11 millions de tonnes produites respectivement.

La production européenne participe bien plus faiblement à la production mondiale avec environ 320 000 T d'algues sauvages à plus de 87% en 2013. Les 3 principaux pays européens producteurs sont la Norvège à hauteur de 48% de la production européenne, la France à hauteur de 22% puis le Danemark à hauteur de 13% (Lesueur & Comparini, 2015). Plus anecdotiquement, l'Irlande, l'Islande et la Russie sont aussi producteurs d'algues. Trois espèces sont majoritairement exploitées : *Laminaria digitata*, *L. hyperborea* et *Ascophyllum nodosum*.

3.1.2 En France

D'après des données de 2010, une vingtaine d'espèces est récoltée ou cultivée en France (Mesnildrey et al., 2012). La production française est estimée entre 70 000 et 90 000 T récoltées chaque année avec une majorité d'algues sauvages (Mesnildrey et al., 2012 ; Lesueur & Comparini, 2015). En effet, seulement 50 T d'algues proviennent de l'algoculture. Le chiffre d'affaires en France est estimé à environ 425 millions € (Idealg). La majorité de la production française s'effectue en Bretagne et anecdotiquement au Pays Basque par le ramassage d'algues rouges d'échouage (Lesueur & Comparini, 2015) (Figure 1-6).

3.1.3 En Bretagne

En Bretagne, la récolte des algues a toujours conservé une place prépondérante dans l'histoire des populations côtières (Arzel, 1987). Cette récolte se fait de deux manières, soit par bateau, soit à pied.

- Récolte en bateau

Ce sont les grandes laminaires qui sont récoltées par bateau par les goémoniers, notamment *Laminaria digitata* et *L. hyperborea*. Selon la Chambre Syndicale des Algues, environ 58 479 T de Laminariales (*L. digitata* et *L. hyperborea*) ont été récoltées par bateau pour un chiffre d'affaires de 1,7 à 2,7 millions d'euros en 2008, 46 226 T en 2009, 45 000 T en 2010 (en comptabilisant seulement *L. digitata*) et 60 000 T en 2011 (Mesnildrey et al., 2012).

L. digita est récoltée par bateau à l'aide d'un engin appelé « scoubidou », inventé dans les années 1960, qui ressemble à un crochet qui tourne autour de lui-même (Mesnildrey et al., 2012). Quand à *L. hyperborea*, elle est récoltée avec un autre outil appelé peigne norvégien correspondant à un grand rateau traîné dans les champs de laminaires sur lequel les plus grands spécimens restent accrochés (Mesnildrey et al., 2012).

- Récolte à pied

D'après la Chambre Syndicale des Algues, la récolte des algues de rive en 2008 était de l'ordre de 6 746 T avec 5 898 T pour les algues brunes, 105 T pour les algues vertes et 706 T pour les algues rouges. Des données déclaratives obtenues lors du programme « Biomasse Algue » réalisé par le Comité Régional des Pêches Maritimes et des Elevages Marins de Bretagne (CPMEM) nous permettent de connaître les tonnages récoltés des algues pendant les années 2014, 2015 et 2016 (Tableau 1-1).

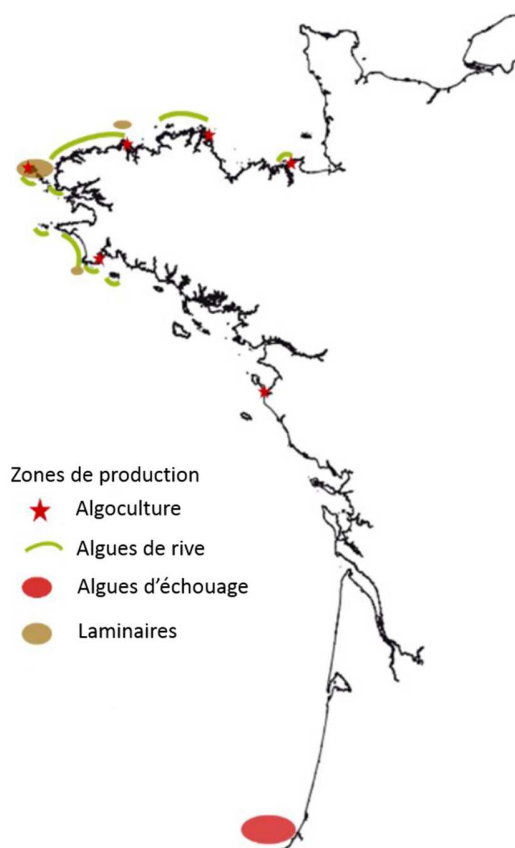


Figure 1-6: Carte de la zone côtière atlantique de la France représentant les zones de production des macroalgues par Mesnildrey et al. (2012), modifié par Lesueur & Comparini (2015).

Tableau 1-1 : Tonnages d'algues de rive récoltées à pied, réparties sur les 4 départements bretons : Finistère, Côtes d'Armor, Île-et-Vilaine et Morbihan. ND=non déterminé (Données du CRPMEM).

	2008	2014	2015	2016
Finistère	ND	3 661,0	2 671,6	2 508,6
Côtes d'Armor	ND	2 138,4	2 219,4	2 165,2
Île-et-Vilaine	ND	3,2	ND	3,5
Morbihan	ND	0,3	ND	0,1
Totalité	5 898,0	5 802,9	>4 891,0	4 677,4

La comparaison entre l'année 2008 et l'année 2014 ne montre pas de variation en termes de biomasse totale récoltée sur le littoral breton. Cependant, entre les années 2014 et 2016, une diminution de la biomasse totale récoltée est observée principalement due à une diminution de la récolte finistérienne passant de 63,1 à 53,6% de la récolte bretonne.

En Bretagne, ce sont principalement deux départements, le Finistère et les Côtes d'Armor, qui réalisent la récolte avec une proportion plus importante pour le Finistère en 2014 mais qui s'équilibre avec les Côtes d'Armor en 2016. Les algues de rive sont récoltées par plus de 400 récoltants, tous professionnels agréés.

3.1.4 Culture des algues ou l'algoculture

L'algoculture désigne la culture en masse des algues alimentaire surtout et, réglementairement, fait partie de l'aquaculture (Laine-Penel et al., 2016). L'algoculture dans le monde est majoritairement réalisée par les pays asiatiques. En effet, le Japon, la Chine et la Corée du Sud font partie des 5 principaux producteurs d'algues (Mazarrasa et al., 2014). L'algoculture s'est développée en Bretagne dans les années 1980 par l'algue *Undaria pinnatifida*, grâce à la maîtrise technique de sa culture et son potentiel commercial (Pérez et al., 1990 ; Laine-Penel et al., 2016). Le tonnage issu de l'algoculture en Bretagne est mal connu et serait entre 50 et 1300 T d'algues produites. Selon Lesueur & Comparini (2015), ce tonnage a été estimé à 350 T d'algues en 2013. Les algues peuvent être cultivées sur différents supports facilitant la récolte, et le plus souvent *in situ* (Balay et al., 2012). La production en mer est saisonnière, la pousse se faisant entre avril et novembre. Avant la phase de grossissement en mer, une étape d'ensemencement est nécessaire sur les supports de culture. Il existe 3 techniques différentes (Balay et al., 2012) : la première technique est le captage naturel, les supports sont installés à proximité des populations d'algues naturelles et les jeunes algues vont venir s'y fixer ; la deuxième technique correspond au bouturage c'est-à-dire que les algues sont fractionnées et insérées dans des cordages ; enfin, la troisième technique correspond à la production de plantules en éclosérie grâce notamment à la technique de culture du « free-living » (Encart 1). D'après

l'étude menée par Laine Penel et al. (2016), 15 entreprises pratiquent l'algoculture en Bretagne comme activité secondaire et 5 entreprises comme activité principale. Ces 5 entreprises produisent principalement des macroalgues sur filières en mer. Parmi ces 15 entreprises, certaines se spécialisent dans des domaines de valorisation comme la cosmétique ; c'est le cas d'au moins deux entreprises bretonnes, BiotechMarine (filiale de SEPPIC, <https://www.seppic.com/fr/seppic/biotechmarine>) et Codif Technologie naturelle (<http://www.codif-tn.com/>). A l'inverse, ces sociétés ne cultivent pas les algues sur filières en mer mais plutôt à terre en « free living » (Encart 1). Certaines techniques de production d'algues sont maîtrisées en France comme la culture d'*U. pinnatifida*, mais il n'en est pas de même pour l'ensemble des espèces cultivables, ni pour toutes les techniques de culture (Laine-Penel et al., 2016). La domestication des algues est rendue plus simple dès lors que leur cycle de vie est connu et reproductible en laboratoire. L'algoculture a un avenir prometteur puisqu'elle apporte notamment plus d'avantages que d'impact sur l'environnement (Mazarrasa et al., 2014). En effet, en pratiquant la photosynthèse pour vivre, l'algue capture le CO₂ et rejète de l'O₂ participant à la production d'O₂ dans la nature et au stockage du carbone. Cependant, les algues en culture peuvent avoir un coût important pour un industriel lorsque la première étape de développement de l'algue est faite en laboratoire.

Encart 1

Le culture en « free-living »

Cette technique, développée par les coréens dans les années 1970 (Pérez et al., 1990) et améliorée par l'Ifremer de Nantes (France) en 1983, se caractérise par un ensemencement réalisé à partir de gamétophytes d'*Undaria pinnatifida* obtenus à volonté au laboratoire, qui est décrite par Pérez et al. (1990). Des fragments fertiles de sporophytes sont lavés et brossés dans une succession de bain d'eau de mer stérile ou javellisée. Ils sont séchés et mis à l'obscurité pour quelques heures. Ensuite, les fragments sont plongés dans de l'eau de mer stérile et fraîche (15°C) : les spores sont ainsi émises et récupérées après filtration par tamis pour enlever les substances mucilagineuses. Elles sont ensuite ajoutées dans une solution nutritive dans un ballon contenant un précipité où les spores pourront se fixer. Ainsi, au bout de quelques jours, des gamétophytes nés de la germination des spores vont se trouver dans la solution nutritive en suspension, culture appelée ainsi « Free-living ». Pour avoir un grand nombre de zygote et donc de nouvelles plantules, il faut produire beaucoup de gamétophytes : dans un premier temps il faut empêcher les gamétophytes de devenir fertile en les exposant à une température plus élevée (22°C) et un éclairage continu spécifique (40 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$). La croissance des gamétophytes s'arrête lorsque le ballon devient opaque, car contenant une forte biomasse de gamétophytes, et que la photosynthèse ne peut se réaliser. Il est possible de maintenir les gamétophytes ainsi en renouvelant le milieu régulièrement. Ensuite, lorsque l'ensemencement est souhaité, les gamétophytes sont remis dans des conditions propices c'est-à-dire à de plus basses températures (15°C) et à un éclairage photopériodique qui favorisent la gamétogénèse et la formation de plantules. Cette solution sera ensuite pulvérisée sur des cordelettes de collecteurs placées dans des bassins et destinées ensuite à être mises sur des filières en mer.

3.2 Utilisations principales des macroalgues

Considérant la forte biodiversité des espèces d'algues et leur abondance de part le monde, les produits à base d'algues sont à l'heure actuelle visibles dans de nombreux domaines industriels. Dans le monde, les algues sont principalement utilisées dans l'alimentation comme « légumes » à hauteur de 58% mais aussi en tant que texturant à hauteur de 39% (Figure 1-7). Elles sont ensuite utilisées dans d'autres domaines tels que la chimie et la microbiologie pour les milieux de culture, la cosmétique, la nutraceutique ou la pharmaceutique, le traitement des eaux ou encore l'agrofourmiture en tant que produits phytosanitaires, engrais ou aliments pour bétails (Lesueur & Comparini, 2015). En France, la part du marché la plus grande se trouve dans les texturants à 94% (Figure 1-7), suivi par les autres domaines très variés (chimie, agriculture ou cosmétique). La part de l'algue en tant qu'aliment en France est très faible (1%). La valorisation des algues est un marché en pleine expansion. Mazarrasa et al. (2014) ont montré que les brevets sur les algues déposés entre 1980 et 2009 sont principalement dans le domaine alimentaire (37,7%), suivi de l'agriculture et des technologies d'aquaculture (19,3%) puis de la santé humaine (13,2%). La cosmétique est un domaine en essor puisqu'il se situe en 5^{ème} position d'applications en termes de brevets déposés, et 6^{ème} position dans les articles scientifiques. De plus, le nombre de brevets et articles scientifiques sur les algues de manière générale, dont la valorisation en cosmétique, augmente chaque année. Il existe une demande croissante de produits contenant des molécules à haute valeur ajoutée. Cette section présente la valorisation des molécules d'algues brunes dans un premier temps succinctement pour les domaines de l'alimentation, de l'agriculture et de l'agroalimentaire et dans un second, un focus est réalisé sur l'utilisation des algues brunes dans le domaine de la santé, et de la cosmétique.

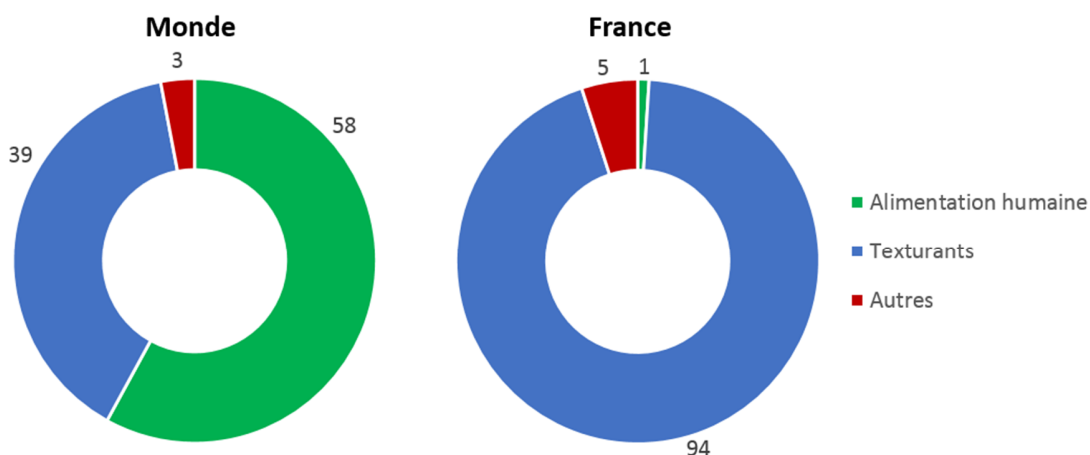


Figure 1-7 : Utilisation des macroalgues dans le monde et en France (FAO, 2014 ; Lesueur & Comparini, 2015).

3.2.1 Les molécules valorisées chez les macroalgues brunes

Les principales molécules d'algues brunes valorisées dans les différents domaines de la santé, de la pharmacie ou encore de la cosmétique sont représentées sur la [Figure 1-8 \(Stengel & Connan, 2011 ; Wijesinghe & Jeon, 2011 ; Kadam et al., 2015a ; Stiger-Pouvreau & Guérard, 2018\)](#). Les principaux pigments des algues brunes sont les chlorophylles *a* et *c*, mais aussi les xanthophylles tels que la fucoxanthine ([De Reviere, 2003](#)). Les polysaccharides de la paroi cellulaire des algues sont la cellulose, les fucanes et les alginates ([De Reviere, 2003](#)). Les fucanes principalement retrouvés sont les fucoïdanes, polysaccharides sulfatés, et principalement retrouvés chez les Fucales et les Laminariales ([Gupta & Abu-Ghannam, 2011a](#)). Le fucoïdane est un polysaccharide contenant selon les espèces un certain pourcentage de groupe L-fucose et d'ester sulfate. L'alginate ou acide alginique correspond à un polysaccharide linéaire contenant de l'acide β -D-mannuronique et de l'acide α -L-guluronique lié par une liaison 1,4. Ils sont la plupart du temps produits sous forme d'alginate de sodium ou de calcium. Les polysaccharides de réserve comme le mannitol ou la laminarine (ou le laminarane) qui est un β 1-3 glucane comportant un degré variable de liaisons β 1-6 et un ou plusieurs résidus mannitol, sont également des molécules valorisées ([De Reviere, 2003](#)).

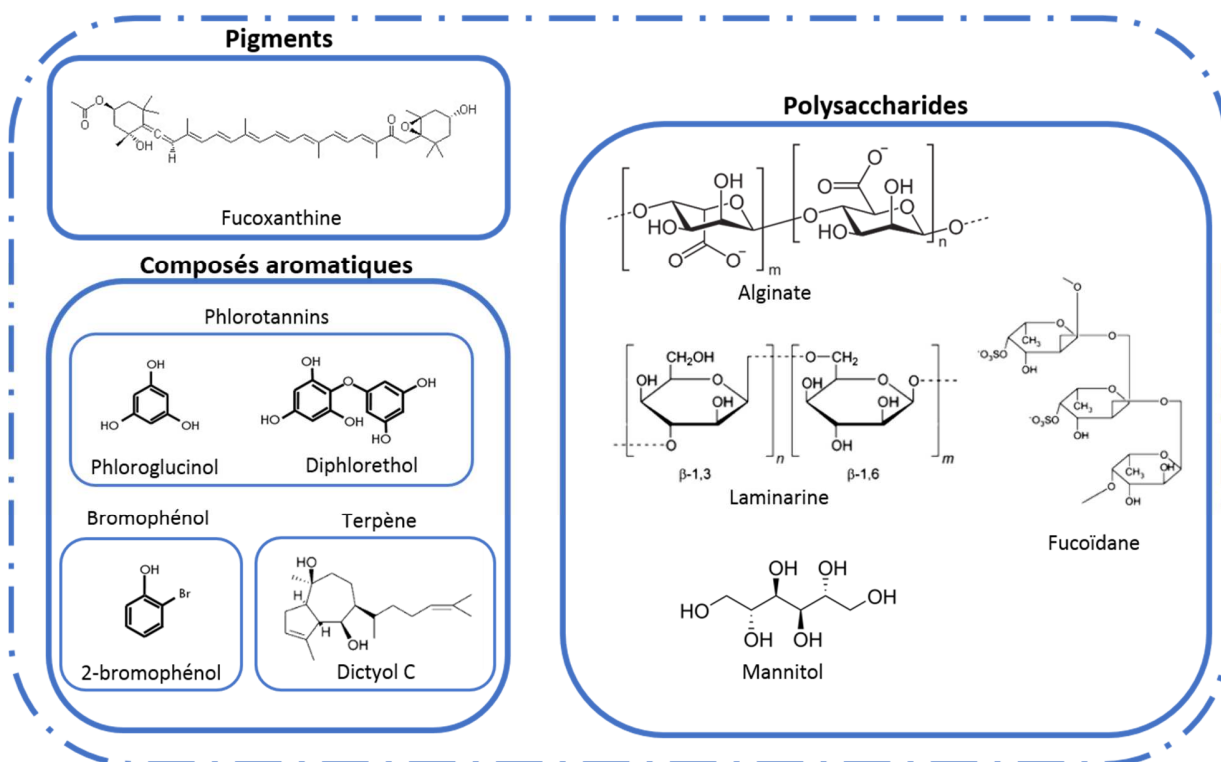


Figure 1-8: Molécules algales valorisées dans les différents domaines industriels ([De Reviere, 2003](#)).

Par ailleurs, des composés phénoliques spécifiques, appelés phlorotannins, sont retrouvées uniquement chez les macroalgues brunes. Ceux-ci peuvent se retrouver dans la paroi cellulaire mais aussi au sein de vésicules appelées physodes. Différents types de phlorotannins sont retrouvés selon les espèces d'algues et ont été développés dans ce Chapitre (pages 20-25). Des composés aromatiques mais halogénés non volatiles ou volatiles peuvent être également présents chez les algues brunes, tels que les terpènes et les bromophénols respectivement.

3.2.2 Macroalgues brunes et agriculture

Traditionnellement, les algues brunes ont toujours été valorisées en tant qu'engrais, amendement pour le sol ou comme alimentation pour le bétail. Divers produits commerciaux utilisent des algues brunes, comme la poudre Acadian™ ou Kelp Meal d'Acadian Agritech et Acadian Seaplants Ltd (Canada, <https://www.acadianseaplants.com/>), les extraits alG-ultra du groupe de De Sangosse (France, <https://www.desangosse.fr/>), Alg-A-Mic™ de BioBizz (Espagne, <https://biobizz.com/>), Biovita de PI Industries Ltd (Inde, <https://www.piindustries.com/>) (Stengel & Connan, 2015). Un extrait de *Macrocystis pyrifera* (AgroKelp) de Algas y Bioderivados Marinos (Albiomar ; Mexique, <http://www.albiomar.com/>) et un extrait d'*Ecklonia maxima* (Kelpak®) de Sumi Agro France (<https://www.sumiagro.fr/accueil>) sont aussi employés comme biostimulants. Les espèces les plus utilisées sont les Fucales comme *Ascophyllum nodosum* et *Fucus* spp. dont *F. serratus* (Khan et al., 2009). Les travaux de Mukherjee & Patel (2019) résument le rôle d'extraits d'algues brunes en tant que biostimulants. La haute concentration des Fucales en potassium, minéraux ou promoteurs de croissance comme les cytokinines et les acides aminés facilitent une croissance de qualité des légumes ou des plantes comme les tomates, les haricots de Lima ou l'Arabette des dames (Khan et al., 2009). La laminarine, polysaccharide extrait des Laminariales, a permis de stimuler les réponses de défense naturelle chez les plantes, comme l'arabette des dames, et serait impliquée dans l'activation de gènes codant pour des protéines anti-microbiennes face à des agents pathogènes (Fritig et al., 1998 ; Khan et al., 2009). En effet, Stengel & Connan (2015) ont recensé un produit de Goëmar (Vacciplant® ; France, <https://www.goemar.com/>) ayant pour principe actif la laminarine, permettant de stimuler les défenses des cultures en renforçant leur résistance contre les pathogènes. Les cytokinines, hormones de croissance présentes chez les algues, pourraient avoir un rôle intéressant sur la croissance de plantes. Crouch & van Staden (1991) ont montré qu'un extrait d'*Ecklonia cava* riche en composés organiques aromatiques permettait une croissance racinaire importante des haricots mungo. D'autre part, un extrait d'*A. nodosum* riche en bêtaines, a montré une augmentation de la teneur en chlorophylle des plantes (tomate, haricot, blé, orge, maïs) en empêchant sa dégradation (Blunden et al., 1996). Les alginates ont également révélé des activités intéressantes pour les sols de culture : les sels

d'acide alginique se combinent avec les ions métalliques du sol formant des complexes qui absorbent l'humidité et améliorent ainsi l'aération du sol permettant de stimuler la croissance du système racinaire des plantes (comme les tomates) et des bactéries du sol (Khan et al., 2009). Sanjeewa & Jeon (2018) ont également montré que l'alginate peut être utilisé en tant qu'immuno-stimulant en aquaculture pour augmenter la résistance aux maladies chez les animaux en élevage, comme les ormeaux ou les crevettes.

3.2.3 Macroalgues brunes et alimentation – agroalimentaire

En France, il existe une liste des algues comestibles comprenant 21 espèces dont 7 macroalgues brunes : *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Himanthalia elongata*, *Undaria pinnatifida*, *Laminaria digitata*, *Saccharina latissima* et *S. japonica* (CEVA, 2011). Ces algues peuvent être utilisées directement, comme un légume, fraîches, séchées, congelées, mises en bocaux ou bien encore salées. Quelques espèces, notamment *Fucus* spp. et *A. nodosum*, sont utilisées comme décors en poissonnerie. Les macroalgues brunes récoltées par bateau, dont *L. digitata* et *L. hyperborea*, et les algues récoltées à pied comme *A. nodosum*, *H. elongata* et *Fucus serratus*, sont destinées principalement à la production de phycocolloïdes (Connan, 2004). Ce marché de phycocolloïdes contribue fortement au chiffre d'affaires de la filière des macroalgues en France et représente une part de 20 % du marché mondial (Lesueur & Comparini, 2015). Ces alginates sont utilisés en tant qu'agent gélifiant, épaississant ou encore stabilisateur de nombreux produits dans l'industrie alimentaire mais aussi pour d'autres activités plus anecdotiques comme le textile (Cardozo et al., 2007). Dans les produits, nous les retrouvons sous la nomenclature européenne notés d'E400 à E405 (Balay et al., 2012). Par exemple, Stengel & Connan (2015) ont recensé des extraits algaux riches en alginate et produits par l'entreprise Algaia (France, <https://www.algaia.com/>) sous le nom d'Algogel™ et Satialgine™ comme agent gélifiant et épaississant respectivement pour l'industrie alimentaire notamment dans les crèmes dessert, les crèmes glacées ou les produits en poudre.

3.2.4 Macroalgues brunes et Santé

La recherche de molécules naturelles dans le domaine de la santé est en constante augmentation. Les molécules des algues présentent de nombreuses propriétés intéressantes pour le bien-être humain et pour les domaines pharmaceutique et de la médecine : antioxydants, anti-cancer, antimicrobiens, anti-viral, anti-obésité, anti-fouling ou encore comme biomatériaux (Stengel & Connan, 2015). Ces propriétés sont dues à de nombreuses molécules présentes : phycocolloïdes, pigments, composés phénoliques, protéines, lipides ou encore les composés halogénés et terpènes. La fucoxanthine, présentent notamment de nombreuses propriétés telles que les activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-cancer, anti-obésité, antidiabétique ou encore anti-malaria (Peng et al., 2011 ; Wijesinghe & Jeon, 2011 ; Thomas & Kim 2013 ; Brunt & Burgess, 2017 ; Łęska et al., 2018). Par exemple, la fucoxanthine extraite d'*Eisenia*

bicyclis a montré des activités antioxydante et anti-inflammatoire (Shang et al., 2011). Cette fucoxanthine extrait cette fois-ci d'*U. pinnatifida* a démontré également une activité anti-obésité grâce à la diminution de graisse dans les cellules adipeuses par augmentation de l'expression d'une protéine mitochondriale (UCP1) impliquée dans la thermogénèse métabolique (Maeda et al., 2005). Les polysaccharides des algues brunes tels que les alginates sont largement utilisés dans les préparations pharmaceutiques (Wijesinghe & Jeon, 2011) mais aussi pour des applications biomédicales telles que le génie tissulaire, les systèmes d'administration de médicaments ou la cicatrisation de blessures (Chandika et al., 2015). Un exemple utilisé très largement est le Gaviscon, utilisé comme anti-acide pour l'oesophage (Blunden, 1993). Stiger-Pouvreau & Guérard (2018) ont recensé des exemples de produits pansements commercialisés contenant de l'alginate comme DermaGinate® Dressing (DermaRite ; Norvège, <http://dermarite.com/>), des pansements d'alginate de calcium. Les polysaccharides sulfatés, les fucoïdanes, présentent de nombreuses propriétés à fort potentiel pour le domaine de la santé telles que des activités antitumorales, antivirales, antioxydantes, anti-inflammatoires (Wijesinghe & Jeon, 2011 ; Thomas & Kim, 2013). Le mannitol, polyol très largement présent chez les algues brunes, est également utilisé comme additif dans les produits alimentaires ou dans les chewing gum, notamment pour leur faible affinité à l'eau (Baweja et al., 2016). Quant aux lipides, des acides gras et des stérols d'*Undaria pinnatifida* et d'*Himanthalia elongata* permettraient de réduire le risque de maladies cardiovasculaires et de réduire le cholestérol total et le LDL (Shalaby, 2011). Cette réduction de cholestérol serait également permise grâce aux terpènes de *Cystoseires* (Shalaby, 2011). Les composés phénoliques des algues brunes, les phlorotannins, possèdent aussi ce large éventail d'activités présentées en début de ce paragraphe et sont développées dans ce Chapitre (pages 33-54).

3.2.5 Macroalgues brunes et Cosmétique

Une tendance globale pour les produits sains, écologiques, durables, conduit les industries cosmétiques à financer la recherche et le développement de nouveaux actifs contenant des composés ou extraits de sources naturelles. En effet, une enquête sur les attentes, sensibilités et comportements des Français en matière de consommation (menée par le cabinet Ethicity) a montré que 56% des Français privilégient les produits plus naturels systématiquement ou régulièrement (CosmeticObs, 2018). De plus, bien que la santé et le plaisir dirigent principalement l'acte d'achat, les consommateurs jugent très important de connaître la composition du produit (64%), l'origine des matières premières (54%) ou encore l'impact sur la biodiversité (35%). De nombreux articles scientifiques font déjà état de plusieurs molécules algales valorisées dans le domaine de la cosmétique comme Thomas & Kim (2013), Bedoux et al. (2014), Stengel & Connan (2015), Wang et al. (2015), Couteau & Coiffard (2016), Ariede et al. (2017), Berthon et al. (2017),

Brunt & Burgess (2017), Cardozo et al. (2007), Pimentel et al. (2017), Stiger-Pouvreau & Guérard (2018), Łęska et al., (2018), Sanjeewa & Jeon (2018) et Gager et al. (2019) en pages 18-59.

3.2.5.1 Propriétés hydratantes et texturantes

Les polysaccharides jouent un rôle très important dans les formulations cosmétiques en tant qu'humectant et hydratant, mais aussi comme agent texturant. Selon Pimentel et al. (2018), un extrait de *Fucus vesiculosus*, riche en polysaccharides (Akomarine® Fucus d'Akott) est exploité en tant qu'agent adoucissant et augmentant l'élasticité de la peau (Italie, <http://www.akott.it/>). Un extrait d'une autre Fucaceae, *Pelvetia canaliculata*, est commercialisé en tant qu'agent hydratant pour les cheveux (Xylishine™ par BiotechMarine). Stiger-Pouvreau & Guérard (2018) ont recensé un extrait cosmétique nommé Seaweed Caviar d'AgriMer (France, <https://www.agriMer.com/>) utilisé dans des perles cosmétiques comprenant des polysaccharides d'algues pour leur rôle d'agent dispersant. Un extrait de *Saccharina japonica* riche en hydrocolloïdes et introduit dans une crème cosmétique à une concentration de 5-10% a permis d'obtenir des activités hydratantes *in vivo* prometteuses (Choi et al., 2013). Les polysaccharides les plus utilisés en cosmétique sont les alginates et les fucoïdanes. Concernant les alginates, ils sont largement utilisés dans le domaine de la cosmétique comme agent épaississant et liant car cette macromolécule absorbe rapidement l'eau (Wijesinghe & Jeon, 2011). Stengel & Connan (2015) ont recensé des extraits riches en alginate : Algogel™ et Satialgine™ produits par l'entreprise Algaia (France, <https://www.algaia.com/>) utilisés en agriculture mais aussi valorisés comme agent gélifiant et épaississant dans le domaine de la cosmétique.

Concernant les fucoïdanes, de part leur conformation et leurs extrémités sulfatées, ces molécules ont la capacité de stocker l'eau et de se lier à la kératine par des liaisons hydrogène, permettant d'améliorer l'hydratation de la peau (Bedoux et al., 2014). Les fucoïdanes permettraient également la migration et la prolifération de fibroblastes et modulerait la protéolyse tissulaire (Wijesinghe & Jeon, 2011 ; Thomas & Kim, 2013 ; Bedoux et al., 2014 ; Berthon et al., 2017). De plus, Wang et al. (2013) ont montré que des polysaccharides de type fucoïdane, extraits de *Saccharina japonica*, ont révélé des propriétés hydratantes meilleures que l'acide hyaluronique, molécule très utilisée en cosmétique pour ces mêmes propriétés. Ils ont également remarqué que le groupement sulfate est le site actif principal pour l'absorption et la capacité de rétention de l'eau. De plus, les polysaccharides de poids moléculaire plus faible ont présenté de meilleures activités. La société Algues & Mer (France, <http://www.algues-et-mer.com/>) valorisait un extrait d'*Ascophyllum nodosum* (Ascophyscient®) pour sa richesse en fucanes de bas poids moléculaire et sa capacité à inhiber la dégradation enzymatique de l'élastine et du collagène, fibres importantes pour le maintien de la peau. Le Groupe Solabia (France, <http://www.solabia.com/>), quant à lui, valorise un extrait

de la même algue (Invicity®) contenant des fucoïdanes de haut poids moléculaire, utilisé pour prévenir la pollution et comme soin anti-âge et anti-rougeur. Ce même fournisseur propose un polysaccharide anionique de haut poids moléculaire obtenu par fermentation bactérienne à partir de *Fucus* sp. (Fucogel®). Cet extrait présente des propriétés apaisantes, hydratantes, anti-âge et restructurant. Stengel & Connan (2015) ont également inventorié un extrait hautement purifié de fucoïdane provenant d'*Undaria pinnatifida* ayant des propriétés hydratantes et anti-âge, vendu sous le nom de Maritech® Reverse par l'entreprise Marinova (Australie, <https://www.marinova.com.au/>).

3.2.5.2 Propriétés antioxydantes et anti-âge

Peu d'extraits lipophiles d'algues brunes sont mis en avant que ce soit dans les publications scientifiques ou dans des extraits commercialisés. Le fournisseur BiotechMarine (SEPPIC ; France, <https://www.seppic.com/seppic/biotechmarine>) commercialise un extrait lipophile d'*Alaria esculenta* (Kalpariane® AD) en tant qu'actif anti-âge. Marine Bamboo TG d'Odycea (France, <https://odycea-france.com/>) contient un extrait d'*Himanthalia elongata* enrichi en fucostérol et phyco-caroténoïdes utilisé pour ses propriétés anti-pollution et anti-âge. Les stérols d'*Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata* et de *Cystoseira* spp. réduisent le cholestérol total et LDL. Les composés phénoliques des algues brunes, ou phlorotannins sont aussi des molécules valorisées pour leurs propriétés antioxydantes. De nombreuses publications ont mis en avant leurs nombreuses propriétés dont une réalisée à ce sujet dans ce Chapitre pages 33-36 (Li et al., 2011 ; Thomas & Kim, 2011 ; Imbs & Zvyagintseva, 2018 ; Gager et al. 2019 ; Vo et al. 2019).

3.2.5.3 Propriétés photoprotectrices et blanchissantes

Les pigments ont très souvent un rôle de protection contre radiations UV. C'est le cas de la fucoxanthine : Heo & Jeon (2009) ont montré l'effet photoprotecteur de fucoxanthine isolée de *Sargassum siliquastrum*. La fucoxanthine isolée de *Saccharina japonica* cette fois-ci a montré une activité anti-tyrosinase et une inhibition de la mélanogénèse (Thomas & Kim, 2013). Les phlorotannins apportent également des propriétés photoprotectrices et blanchissantes développées précédemment (pages 50-54). Par exemple, des phlorotannins extraits d'*Ecklonia cava* ont démontré une inhibition de la mélanogénèse et une inhibition de la tyrosinase apportant une activité blanchissante mais aussi un effet protecteur contre les radiations UVB apportant une activité photoprotectrice (Kang et al., 2004 ; Heo et al., 2009 ; Yoon et al., 2009 ; Cha et al., 2012). Par ailleurs, une fraction enrichie en composés phénoliques, isolée d'*Halidrys siliquosa*, a montré une activité photoprotectrice similaire à des filtres solaires synthétiques commercialisés comme l'homosalate (Le Lann et al., 2016).

3.2.5.4 Propriétés amincissantes : l'iode

L'iode est impliqué dans le métabolisme de la thyroïde et les hormones thyroïdiennes favorisent la lipolyse (Couteau & Coiffard, 2016). Ainsi, les espèces de macroalgues riches en iode sont recherchées par l'industrie cosmétique afin de les utiliser comme agent amincissant. Par exemple, *Saccharina japonica* peut atteindre des teneurs en iode de l'ordre de 3g/kg de poids sec de l'algue (Morita et al., 2010). En effet, des extraits de *Fucus* et de *Laminaria* sont souvent couplés en cosmétique à de la caféine en tant qu'actifs amincissants. Cependant l'iode est interdit en cosmétique puisqu'agissant au niveau de la thyroïde et dépassant ainsi le domaine de la cosmétique (Règlement EC 1223/2009 Annexe II).

3.3 Accessibilité à la ressource

La valorisation dans un domaine industriel particulier de macroalgues récoltées sur l'estran nécessite la mise en place d'une exploitation durable et donc d'une législation particulière. Le protocole de Nagoya (<https://www.cbd.int/abs/doc/protocol/nagoya-protocol-fr.pdf>) a été mis en place pour la préservation de la biodiversité pour permettre de garantir la souveraineté des pays concernant leurs richesses biologiques, ressources animales et végétales. Il a été adopté par 92 pays durant la 10^{ème} Conférence des Parties à la Convention sur la diversité biologique à Nagoya en octobre 2010 est entré en vigueur en octobre 2014. Le principe du protocole est représenté sur la Figure 1-9. Ainsi, ce protocole permet des négociations entre les chercheurs et le gouvernement du pays concerné par la ressource valorisable. Ce protocole est donc applicable en cosmétique pour éviter de piller les ressources des pays. A l'heure actuelle, l'industrie cosmétique doit s'engager dans le concept de la durabilité ou encore dans le développement durable. En d'autres mots, il est important que les entreprises diminuent leurs impacts environnementaux et cela peut passer par plusieurs aspects : un « sourcing » éthique des ingrédients, des méthodes de production biologiques et durables, des formulations basées sur la chimie verte, des emballages durables, une gestion économe de l'eau, une réduction de l'empreinte carbone ou encore une meilleure gestion des déchets (CosmeticObs, 2018). L'orientation vers ce développement durable est encore en chemin et des labels voient le jour notamment en guise de certification. Dans le projet RIV-AGE 2.0, et dans notre étude, ces différentes notions d'impact sur l'environnement ont été recherchées : en effet, une partie de l'étude vise à pouvoir valoriser une biomasse bretonne abondante et non rare et de pouvoir subvenir à des quantités importantes sans pour autant épuiser les ressources. L'objectif de travailler sur des ressources comme les stades précoces pouvant être cultivées dans des conditions contrôlées correspond également à un critère de préservation des ressources. D'autre part, dans notre étude des méthodes d'extraction sont recherchées pour extraire des composés phénoliques, et seulement des méthodes éco-responsables ayant le moins d'impact possible sur l'environnement.

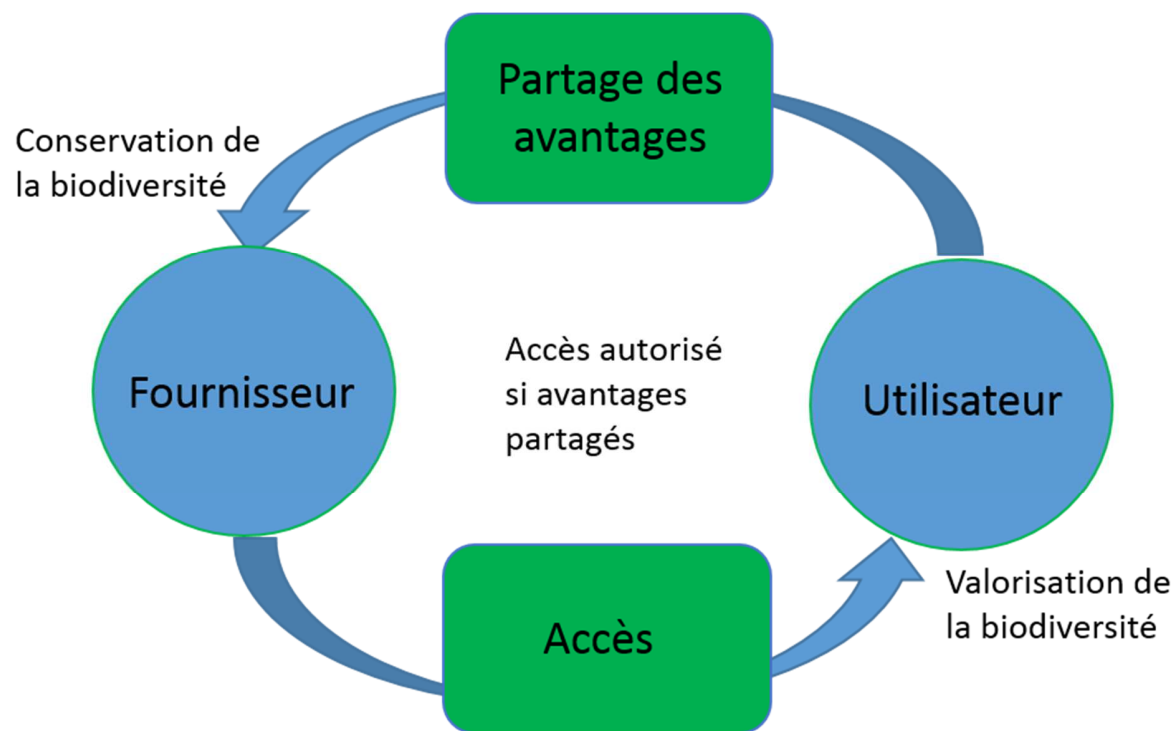


Figure 1-9 : Principe du Protocole de Nagoya (inspiré de Wittmann, 2015).

4 Les modèles biologiques utilisés dans la thèse

Neuf espèces de macroalgues brunes, appartenant à différents ordres, ont été étudiées dans ce travail de thèse. Ces différentes espèces ont été sélectionnées selon plusieurs critères. Dans un premier temps, les algues brunes sont les espèces présentant les plus fortes biomasses sur l'estran breton, notamment dans la zone intertidale. Pour permettre une valorisation industrielle des algues sauvages, des espèces présentes en abondance sur l'estran ont donc été sélectionnées. En plus de leur biomasse importante, ces différentes macroalgues brunes présentent des teneurs élevées en composés phénoliques, notamment les Fucales (Bourgougnon & Stiger-Pouvreau, 2011). De plus, ces espèces présentent des phlorotannins de structure et de tailles variées pouvant présenter diverses propriétés biologiques et apporter des activités différentes et complémentaires. Deux Laminariales, connues en général pour leur plus faible teneur en composés phénoliques, ont été rajoutées aux espèces sélectionnées et étudiées pour leur capacité à être cultivées en filière, ainsi ne dépendant pas des récoltes sauvages. Enfin, deux espèces ont été sélectionnées pour leur capacité à être cultivées en « free living » et pour leur culture maîtrisée par C-Weed Aquaculture. Dans cette partie du Chapitre 1, nous avons décrit les différents modèles biologiques étudiés (grâce à Cabioc'h et al., 2014 ; Bunker et al., 2017 ; <https://www.algaebase.org/>), décrit la méthode de récolte et de séchage des algues ainsi que les teneurs et les types de composés phénoliques de ces algues.

4.1 Espèces étudiées

4.1.1 *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis

4.1.1.1 Description

Cette algue pérenne, aussi appelée goémon noir, possède de longues lanières lisses et coriaces touffues avec une couleur vert olive, jaunâtre à brunâtre d'une taille comprise entre 30 et 150 cm (Figure 1-10). Elle possède également de gros aérocystes et de petits rameaux latéraux. Les thalles peuvent atteindre jusqu'à une dizaine d'années. Son aire de répartition se situe entre l'Atlantique Nord-Est et Nord-Ouest, la Manche et la mer du Nord. Cette algue est retrouvée sous forme d'une ceinture au niveau de l'étage médiolittoral (mi-marée ; Figure 1-2) sur des sites plutôt abrités. C'est une espèce dioïque, c'est-à-dire qu'il existe des individus mâles et des individus femelles. Au moment de la reproduction, en hiver et printemps, les individus mâles possèdent des petits réceptacles

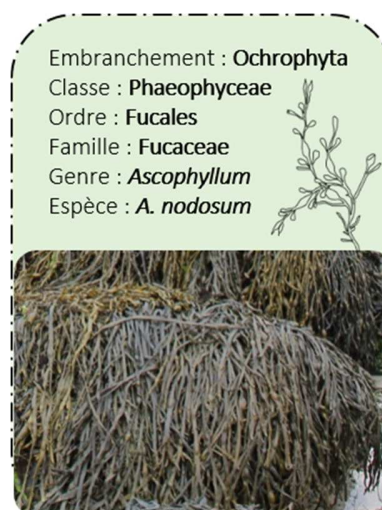


Figure 1-10 : Classification d'*Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis. Photo ©F. Lalegerie

orangés qui sont de couleur olivâtre chez les femelles. Le cycle d'*A. nodosum* est monogénétique diplophasique, soit le cycle classique des Fucales (cf. pages 12-13).

4.1.1.2 Biomasse et récolte en Bretagne

Les champs d'*Ascophyllum nodosum* en Bretagne sont denses et représentent une biomasse importante sur les sites abrités. Il a tout de même été montré que cette biomasse peut dépendre de la saison : en effet, [Connan \(2004\)](#) a montré une matière sèche significativement plus importante en été qu'en hiver sur 2 sites bretons (Portsall et Roscoff). Le Réseau Benthique (Rebent, <http://www.rebent.org/>) coordonné par l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer) a étudié la dynamique des grands peuplements de macroalgues dont *A. nodosum* ([Derrien-Courtel et al., 2010](#)). Les chercheurs impliqués ont montré une régression drastique des populations des Fucales entre 1987 et 2004 sur de nombreux sites bretons. Néanmoins, une recolonisation a été observée depuis 2004. Cette régression a été observée ailleurs en Europe, cependant les causes de ce phénomène ne sont pas parfaitement cernées ([Ar Gall, Com. Pers.](#)).

Lors de la récolte, l'arrachage de l'algue est interdit (selon le Décret n°90-719 ; [Philippe, 2013](#)) et l'algue est coupée avec une faucille ou un couteau afin d'être plus précis et respecter les tailles minimales fixées par la réglementation : coupe réalisée à une hauteur d'au moins 30 cm dans les départements du Finistère, Morbihan, Ille-et-Vilaine et Côtes d'Armor (selon l'Arrêté n°2013-5644, [Philippe, 2013](#)) et d'au moins 20 cm pour le reste de la France (Décret n°90-719 ; [Philippe, 2013](#)). Cette coupe manuelle permet une meilleure cicatrisation et une reprise de croissance pouvant donner de nouveaux individus exploitables en 5 à 6 ans ([Cabioc'h et al., 2014](#)). Il n'existe pas de restriction en termes de période de récolte en France mais des jachères doivent être mises en place dans le Finistère et les Côtes d'Armor selon les années. Il existe cependant un quota dans les Côtes d'Armor, de l'ordre de 3 500 T d'algues fraîches récoltées à pieds sur la totalité du département et 3 000 T autour de l'île de Bréhat par récolte mécanisée (selon l'Arrêté n°2013-5644, [Philippe, 2013](#)). Selon les données de la Chambre Syndicale des Algues (http://www.chambre-syndicale-algues.org/?Algues_et_usages), 2 890, 1 444 et 1 030 T d'*A. nodosum* ont été récoltées dans toute la Bretagne en 2008, 2009 et 2010 respectivement ([Figure 1-11](#)) ([Mesnildrey et al., 2012](#)). Selon les données déclaratives fournies par les récoltants au Comité Régional des Pêches Maritimes et des Elevages Marins De Bretagne (CRPMEM), 1 068,2, 1 029,1 et 1 028,4 T d'*A. nodosum* ont été récoltées dans le Finistère en 2014, 2015 et 2016 respectivement, soit 29, 38 et 41% de la récolte départementale. C'est l'espèce la plus récoltée dans le Finistère. Dans les Côtes d'Armor, la récolte est de l'ordre de 560,3, 629,2 et 522,7 T en 2014, 2015 et 2016 respectivement, soit 26, 28 et 24% de la récolte départementale.

Le pourcentage de récolte serait même plus élevé en 2016 dans les Côtes d'Armor puisque *A. nodosum* a été récoltée en mélange avec *Fucus vesiculosus* avec 65,1 T récoltées soit 3% de la récolte départementale.

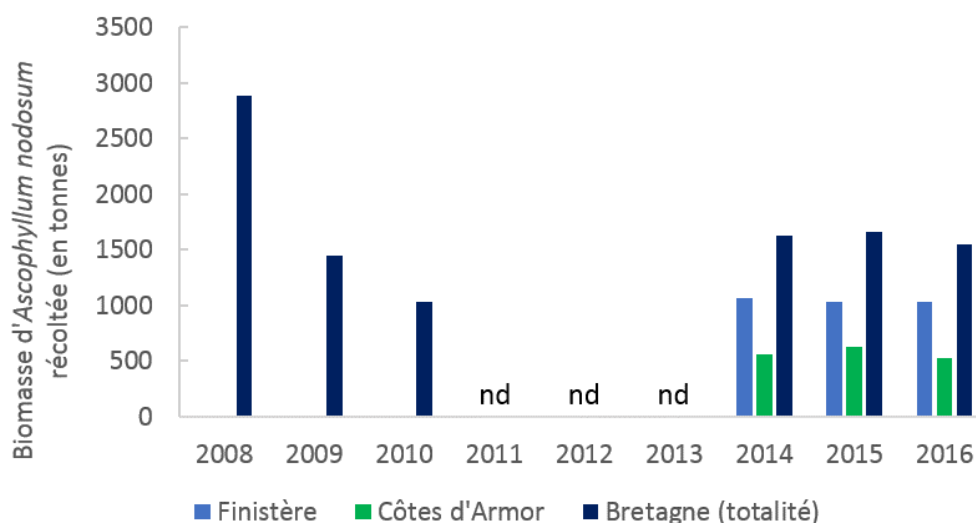


Figure 1-11 : Biomasse d'*Ascophyllum nodosum* récoltée entre 2008 et 2016 dans les départements du Finistère et des Côtes d'Armor ainsi que dans toute la Bretagne selon les données du CRPMEM et Mesnildrey et al. (2012). nd = absence de données pour 2011, 2012 et 2013.

4.1.1.3 Valorisation

La macroalgue brune *Ascophyllum nodosum* est valorisée dans de nombreux domaines, notamment celui de l'alimentaire car elle fait partie de la liste des algues comestibles en France (CEVA, 2011), mais aussi dans les domaines de la santé, la cosmétique ou l'agroalimentaire. Historiquement, elle était utilisée en agriculture en tant qu'engrais pour sa haute teneur en oligoéléments et comme aliment pour le bétail. Auparavant l'extraction d'alginate d'*A. nodosum* était une part importante alors qu'aujourd'hui elle est devenue minime (Mesnildrey et al., 2012). Dans le domaine de l'agriculture, différents extraits de cette algue brune sont valorisés en tant que biostimulants comme l'additif Seactiv dans les produits de la gamme physioactivateurs de Goëmar (France, <https://www.goemar.com/>) ou le composé GA142 dans les produits Fertileader de Timac Agro (France, <https://www.timacagro.fr/>). D'autres extraits de cette algue existent sur le marché en tant que fertiliseur comme Acadian (Acadian Agritech, Canada <https://www.acadianseaplants.com/>) ou Biovita (PI Industries Ltd., Inde, <https://www.piindustries.com/>), et sont résumés par Baweja et al. (2016). De nombreux extraits ou fractions d'*A. nodosum* présentent des activités très prometteuses comme des activités antioxydantes : fractions obtenues par ultrafiltration (Audibert et al., 2010 ; Blanc et al., 2011 ; Tierney et al., 2013c), fraction obtenue par dialyse (Breton et al., 2011), extrait à l'acétone (Jiménez et al., 2010), extrait méthanolique (O'Sullivan et al., 2011 ; Connan et al., 2006), extrait obtenu par micro-onde enrichi en fucoïdane (Yuan & Macquarrie, 2015) ou en

composés phénoliques (Yuan et al., 2018), extrait hydroéthanolique (Agregán et al., 2018). *A. nodosum* contient également des molécules à activité anti-microbienne comme le montre un extrait à l'acétone par Jiménez et al. (2010). Ellouali et al. (1993) et Nakayasu et al. (2009) ont pu démontrer par ailleurs l'activité anti-tumorale de fractions enrichies en fucanes et fucoïdanes. D'autre part, des fractions enrichies en composés phénoliques ont pu mettre en évidence une activité anti-inflammatoire (Barbosa et al., 2017). Toujours dans le domaine de la santé, des extraits aqueux, éthanoliques ou méthanoliques ont montré une activité anti-diabétique par une inhibition des enzymes α -amylase et α -glucosidase (Zhang et al., 2007 ; Lordan et al., 2013 ; Yuan et al., 2018). Dans le domaine de la cosmétique, des extraits à l'acétone ou au méthanol ont montré des propriétés blanchissantes grâce à une activité anti-tyrosinase (Jiménez et al., 2010 ; Yuan et al., 2018). Un extrait aqueux d'*A. nodosum* se trouve notamment sur le marché pour son activité anti-tyrosinase (AlgoWhite®, Codif Technologie Naturelle, France, <http://www.codif-tn.com/>; Bedoux et al., 2014). Des extraits à l'acétone ont par ailleurs démontré une activité photoprotectrice (Guinea et al., 2012). L'entreprise Algues & Mer (France, <http://www.algues-et-mer.com/>) valorise des polysaccharides sulfatés d'*A. nodosum* dans l'extrait Ascophyscient® qui permet d'hydrater et d'avoir une activité anti-âge et anti-inflammatoire tout en activant le renouvellement cellulaire (Stiger-Pouvreau & Guérard et al., 2018). Un autre extrait, cette fois-ci riche en polyphénols, a été commercialisé par l'entreprise Greensea (France, <http://greensea.fr/>) sous le nom de Phytelene EG 744 BG (Stiger-Pouvreau & Guérard, 2018). D'autres extraits sont retrouvés sur L'observatoire des cosmétiques, CosmeticOBS, où ils recensent les produits intégrant l'ingrédient « extrait de Goémon noir » correspondant à un extrait d'*A. nodosum* (<https://cosmeticobs.com/fr/ingredient-cosmetique/ascophyllum-nodosum-extract-2074/>).

4.1.1.4 Composés phénoliques d'*Ascophyllum nodosum*

Ascophyllum nodosum contient une importante teneur en CP : les teneurs peuvent aller jusqu'à plus de 13% du poids sec de l'algue pour un extrait hydrométhanolique (Pavia & Åberg, 1996) ou 89,7% du poids sec de l'extrait pour une fraction purifiée par ultrafiltration (Audibert et al., 2010). Selon Connan (2004) et Tanniou (2014), ces composés sont plutôt de haut poids moléculaire supérieur à 12-14 kDa. Steevensz et al. (2012) ont détecté des phlorotannins ayant des degrés de polymérisation (DP) allant de 1 jusqu'à 39 (1 DP correspond à une unité de phloroglucinol). D'autre part, Tierney et al. (2014) ont montré qu'un extrait hydroéthanolique d'*A. nodosum* contient des phlorotannins de poids moléculaire plus faibles avec des DP entre 6 et 13. Le phlorotannin le plus abondant obtenu était d'une masse de 1117 Da correspondant à un DP de 9. Leurs résultats sont en adéquation avec ceux obtenus par Nwosu et al. (2011) avec la présence d'unités de phloroglucinol lié à un noyau de fucodiphlorethol avec des DP entre 5 et 16 dont les plus abondants sont obtenus à des masses de 1117 et 1241 Da (DP de 9 et 10 respectivement).

Ces résultats sont également en adéquation avec les résultats de Tierney et al. (2013c) qui ont montré des DP entre 4 et 20 avec l'oligomère le plus abondant à 10 DP. Corona et al. (2016) ont identifié la nature de plusieurs phlorotannins d'*A. nodosum* : hydroxytrifuhalol A, 7-hydroxyeckol, tetrafulcol, fucodiphlorethol, difucol, diphlorethol et un dimère phloroglucinol.

4.1.2 *Bifurcaria bifurcata* R. Ross

4.1.2.1 Description

Cette algue pérenne, aussi appelée bifurcaire, se présente sous forme d'axes cylindriques et dichotomes de couleur brun clair (Figure 1-12). La base du thalle est un faux rhizome rampant et non un disque. Son aire de répartition se situe entre la Manche et l'Atlantique (Grande-Bretagne, France, Espagne). C'est une espèce commune du littoral français. Elle forme une ceinture en bas de l'étage médiolittoral en mélange avec *Himanthalia elongata*, à la limite haute de l'étage infralittoral. Elle peut également se retrouver dans les mares de l'étage médiolittoral. C'est une espèce monoïque avec un seul type d'individu qui produit les deux types de gamètes. Durant l'automne, les réceptacles se forment aux extrémités des rameaux formant des renflements. La reproduction se réalise en période automnale/hivernale en Bretagne (Le Lann et al., 2012a).

Embranchement : **Ochrophyta**
Classe : **Phaeophyceae**
Ordre : **Fucales**
Famille : **Sargassaceae**
Genre : ***Bifurcaria***
Espèce : ***B. bifurcata***



Figure 1-12 : Classification de *Bifurcaria bifurcata* R. Ross.
Photo ©F. Lalegerie

4.1.2.2 Biomasse et récolte en Bretagne

Connan (2004) a montré une variation saisonnière de la biomasse de *B. bifurcata* sur 3 sites bretons : la matière sèche était plus importante en été à Portsall et Roscoff alors qu'à Trégunc la biomasse la plus importante était au printemps.

4.1.2.3 Valorisation

Dans la littérature, plusieurs extraits de *B. bifurcata* ont montré des activités antioxydantes : un extrait hydrométhanolique (Le Lann et al., 2008), un extrait au méthanol et au dichlorométhane (Zubia et al., 2009), un extrait méthanolique ou au dichlorométhane (Alves et al., 2016) et un extrait hydroéthanolique (Agregán et al., 2018). Horta et al. (2014) ont pu démontrer une activité anti-bactérienne de fragments d'algues déposés dans de l'agar-agar. De même, un extrait au diethyl ether a montré une activité anti-fouling contre deux bactéries marines ainsi que des larves de balanes (Maréchal et al., 2004). Par ailleurs, un extrait au méthanol et au dichlorométhane a montré une activité anti-tumorale (Zubia et al., 2009). D'autres extraits, cette fois-ci obtenu par macération au chloroforme/méthanol puis acétate

d'éthyle/méthanol (Spavieri et al., 2010) ou des extraits éthanoliques ou à l'acétate d'éthyle (Vontron-Sénécheau et al., 2011) ont révélé une activité anti-parasitaire. Dans le domaine de la cosmétique, un extrait aqueux de *B. bifurcata* avec de l'acétyl-tyrosine a été commercialisé pour ses propriétés d'accélération du bronzage, de protection de la peau et anti-âge (Bronz'alg[®], Greensea, France, <http://greensea.fr/>) (Stiger-Pouvreau & Guérard, 2018).

4.1.2.4 Composés phénoliques de *B. bifurcata*

Les teneurs en CP de *B. bifurcaria* retrouvées dans la littérature peuvent atteindre 4,5% du poids sec de l'algue avec un extrait hydrométhanolique (Le Lann et al., 2008). Glombitza & Rösener (1974) ont identifié des bifuhalols chez *B. bifurcata*, de même que Koch et al. (1981) avec la présence de fuhalolacetate. Stiger-Pouvreau et al. (2014) ont confirmé la présence de fuhalols dans leur étude. D'autre part, Le Lann et al. (2012a) ont mis en évidence une plus forte proportion de phlorotannins de taille inférieure à 2000 Da (DP16) comparativement aux phlorotannins de taille entre 2000 et 5000 Da (équivalent à DP16 et DP40), entre 5000 et 14000 Da et au-delà de 14000 Da. En effet, cette proportion varie entre 60 et plus de 90% selon la saison et le lieu de récolte, avec une augmentation des phlorotannins de taille entre 2000 et 5000 Da en hiver sur un des sites bretons (Pointe du Diable), qui n'est pas observée pour le second site (Porsmeur).

4.1.3 *Fucus serratus* (Linnaeus)

4.1.3.1 Description

Cette algue pérenne, aussi appelée *Fucus* denticulé/dentelé, possède un thalle plat allant jusqu'à 60 cm et divisé en lames dichotomes de couleur brun-vert formant des touffes denses (Figure 1-13). Son aire de répartition se situe entre l'Atlantique Nord-Est et Nord-Ouest, la Manche et la mer du Nord. Elle est retrouvée en ceinture, dans le bas de l'étage médiolittoral en mode battu ou abrité avec une plus forte abondance en milieu abrité. Comme *A. nodosum*, c'est une espèce dioïque : pendant la reproduction, en été/automne, des petits points colorés (conceptacles) apparaissent sur les réceptacles de la même couleur que pour *A. nodosum* (en fonction des sexes des individus). Le cycle de *F. serratus* est monogénétique diplophasique, soit le cycle classique des Fucales (cf. pages 12-13).

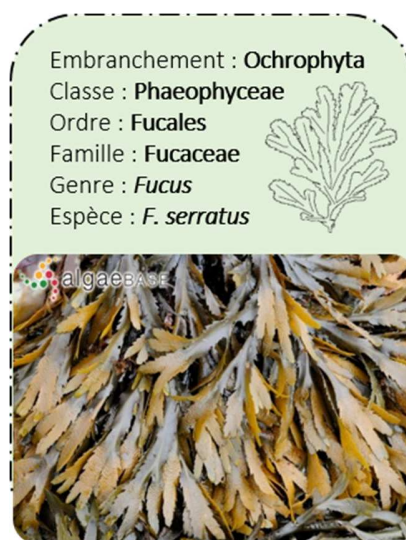


Figure 1-13 : Classification de *Fucus serratus* (Linnaeus).
Photo ©M.D. Guiry

4.1.3.2 Biomasse et récolte en Bretagne

Sur une année, [Connan \(2004\)](#) a montré des variations saisonnières en termes de biomasse : sur deux sites bretons (Portsall et Roscoff), la matière sèche est significativement plus importante en été et plus faible en hiver alors que sur le troisième site (Trégunc), la biomasse est la plus faible au printemps et identique le reste de l'année. L'arrachage de l'algue est interdit (selon le Décret n°90-719 ; [Philippe, 2013](#)) et l'algue doit être récoltée à la faucille ou au couteau sans aucune restriction concernant la taille minimale de récolte ([Philippe, 2013](#)). En 1980, la biomasse de *F. serratus* a été estimée par Ifremer à environ 10 000 T dans les Côtes d'Armor ([Philippe, 2013](#)). Selon les données de la Chambre Syndicale des Algues, 581,0, 268,0 et 2 681,0 T de *F. serratus* ont été récoltés dans toute la Bretagne en 2008, 2009 et 2010 respectivement ([Mesnildrey et al., 2012](#)). D'après les données déclaratives obtenues par le CRPEM, les *Fucus* sont déclarés aussi sous *Fucus* spp. en 2015 : 580,8 et 1 541,1 T ont été récoltés dans le Finistère et les Côtes d'Armor respectivement, soit 22 et 69% de la récolte algale départementale. Dans les départements du Finistère et des Côtes d'Armor, 242,5 et 143,2 T de *F. serratus* ont été récoltés respectivement en 2016. Des algues déclarées sous *Fucus* spp., pouvant comprendre *F. serratus*, atteignent une récolte de l'ordre de 1 064,9 T soit 49% de la récolte départementale dans les Côtes d'Armor. L'ensemble des *Fucus* sont les espèces d'algues brunes les plus récoltées dans les Côtes d'Armor.

4.1.3.3 Valorisation

Les *Fucus* sont récoltés pour diverses utilisations dans les domaines de l'alimentaire, la pharmacie, la cosmétique ou l'agroalimentaire ([Cabioç'h et al., 2014](#)). Plusieurs extraits dans la littérature ont montré des activités antioxydantes : un extrait aqueux ou à l'acétone ([Wang et al., 2009](#)), un extrait méthanolique ou éthanolique ([O'Sullivan et al., 2011 ; 2013](#)), des extraits aqueux, hydroéthanoliques et hydrométhanoliques ([Heffernan et al., 2015a](#)). D'autre part, un extrait aqueux ou éthanolique a montré une activité anti-diabétique par une inhibition de l' α -amylase et l' α -glucosidase ([Lordan et al., 2013](#)). [Vonthron-Sénécheau et al. \(2011\)](#) ont révélé l'activité anti-parasitaire des extraits éthanoliques ou à l'acétate d'éthyle ([Vonthron-Sénécheau et al., 2011](#)). Dans le domaine de la cosmétique, *F. serratus* peut être valorisé par son activité anti-inflammatoire qui a été démontré sur un extrait à l'acétone purifié à l'acétone/eau et enrichi en composés phénoliques ([Barbosa et al., 2017](#)). Gelyma (France, <http://www.gelyma.com/>) commercialise un actif Seavie[®] contenant un extrait aqueux de *F. serratus* permettant de nourrir la peau. D'autres extraits sont retrouvés sur L'observatoire des cosmétiques, CosmeticOBS, où ils recensent les produits intégrant l'ingrédient « extrait d'algue brune *Fucus serratus* (ou Varech) » correspondant à un extrait de *F. serratus* ([79](https://cosmeticobs.com/fr/ingredient-</p></div><div data-bbox=)

cosmétique/fucus-serratus-extract-2202/). L'Observatoire le considère comme un agent de protection de la peau (Bedoux et al., 2014).

4.1.3.4 Composés phénoliques de *F. serratus*

Les teneurs en CP retrouvées chez *F. serratus* peuvent aller jusqu'à 4,3% du poids sec de l'algue pour un extrait hydrométhanolique (Connan, 2004) ou 180,6 µg équivalent phloroglucinol/g d'extrait sec pour un extrait hydroéthanolique (Heffernan et al., 2015b). Heffernan et al. (2015b) ont mis en évidence la présence de phlorotannins à faible poids moléculaire entre 3 et 16 DP. Les principaux sont compris entre 6 et 14 DP. Peu d'études ont identifié les phlorotannins de *F. serratus*, se focalisant davantage sur *F. vesiculosus* qui contient des phlorotannins avec DP entre 3 et 16 dont les plus abondants sont 6, 7 et 8 DP (Heffernan et al., 2015b) ainsi que que des fucophlorethols (fucotriphlorethol A et E, fucotetraphlorethol C, D, E, F et G) (Parys et al., 2007) ou *F. spiralis* qui contient des fucols et des fucophlorethols ainsi que des phlorotannins à des DP entre 3 et 16 (les plus abondants étant DP 4 et 5) (Cérantola et al., 2006 ; Tierney et al., 2014).

4.1.4 *Halidrys siliquosa* (Linnaeus) Lyngbye

4.1.4.1 Description

Cette algue pérenne, aussi appelée queue de poulain, forme de grandes lanières de couleur brune atteignant 1 à 3 m avec des ramifications alternes et des flotteurs en forme de siliques (Figure 1-14). Son aire de répartition se situe dans la Mer du Nord, la Manche et l'Atlantique Nord-Est. En Bretagne, elle est présente en milieu infralittoral, au même niveau que les ceintures de laminaires jamais découvertes par la marée. Cette espèce se fixe également dans les cuvettes de l'étage médiolittoral au niveau de la ceinture à *H. elongata*. Elle préfère les milieux calmes ou semi-battus. C'est une espèce monoïque. La période de fertilité se trouve entre avril et septembre. Le cycle d'*H. siliquosa* est monogénétique diplophasique, soit le cycle classique des Fucales (cf. pages 12-13).

4.1.4.2 Biomasse et récolte en Bretagne

La biomasse est beaucoup moins importante que pour les précédentes Fucales mais elle peut former des patchs très importants. Aucune récolte en Bretagne n'est constatée.



Figure 1-14 : Classification d'*Halidrys siliquosa* (Linnaeus) Lyngbye. Photo ©M. D. Guiry

4.1.4.3 Valorisation

Il s'avère tout de même qu'elle est valorisée notamment dans le domaine de la cosmétique comme le montre le brevet déposé par Gelyma (France, <http://www.gelyma.com/>) sur un extrait aqueux d'*H. siliquosa*, Lightoceane® (Pellegrini & Pellegrini, 2009). Le Lann et al. (2016) ont mis en évidence les activités antioxydante, antibactérienne et photoprotectrice d'une fraction enrichie en composés phénoliques de cette algue. Un extrait au chloroforme/méthanol enrichi en mérodiaterpénoïdes d'*H. siliquosa* a révélé une activité anti-fouling contre des bactéries marines et des larves de balanes (Culioli et al., 2008). Le même type d'extrait purifié ensuite à l'acétate d'éthyle/méthanol a montré une activité anti-parasitaire (Spavieri et al., 2010), ainsi que des extraits éthanoliques ou à l'acétate d'éthyle d'éthyle (Vontron-Sénécheau et al., 2011). D'autre part, une activité anti-tumorale a été mise en évidence sur un extrait au méthanol et au dichlorométhane (Zubia et al., 2009).

4.1.4.4 Composés phénoliques d'*H. siliquosa*

Les CP retrouvées chez *H. siliquosa* peuvent atteindre des teneurs de l'ordre de 17,7% du poids sec pour une fraction purifiée avec notamment de l'acétate d'éthyle (Stiger-Pouvreau et al., 2014) ou 975,7 mg/g d'extrait sec pour le même type de fraction purifiée (Le Lann et al., 2016). Ces mêmes auteurs ont mis en évidence des phlorotannins du type trifuhalol, tetrafuhalol, diphlorethol ainsi que triphlorethol chez *H. siliquosa*.

4.1.5 *Himanthalia elongata* (Linnaeus) Gray

4.1.5.1 Description

Cette algue pérenne, aussi appelée himanthale, haricot ou spagetti de mer, se présente sous forme d'un axe court formant une cupule ou ombrelle de 1 à 2 cm, fixée au substrat par un disque et surmontée de longues lanières lisses brunes/verdâtres qui peuvent atteindre 3 m de longueur (Figure 1-15). Ces lanières correspondent aux parties fertiles de l'algue se régénérant chaque année. Son aire de répartition se situe entre la mer du Nord, la Manche et l'océan Atlantique Nord. Elle forme des ceintures qui matérialisent la fin de l'étage médiolittoral. La plupart du temps elle est immergée car cette espèce ne supporte pas de trop longues exondations. C'est une espèce dioïque avec des individus mâles et des individus femelles. La libération des gamètes se réalise entre le printemps et l'automne.

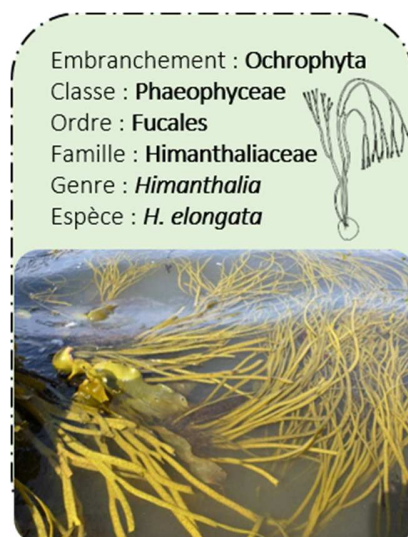


Figure 1-15 : Classification d'*Himanthalia elongata* (Linnaeus) Gray. Photo ©T. Burel

Le cycle d'*H. elongata* est monogénétique diplophasique, soit le cycle classique des Fucales (cf. pages 12-13).

4.1.5.2 Biomasse et récolte en Bretagne

La biomasse d'*H. elongata* évolue significativement selon la période de l'année. [Connan \(2004\)](#) a montré une biomasse significativement plus importante en automne à Portsall, en été à Trégunc et pendant les deux saisons à Roscoff, lorsque les lanières se sont entièrement développées. L'arrachage d'*H. elongata* est interdit (selon le Décret n°90-719 ; [Philippe, 2013](#)), les algues doivent être coupées au dessus de la base des lanières dans les Côtes d'Armor ([Arrêté n°2013-5644](#)) alors que dans le Finistère la récolte est réalisée seulement lorsque les algues mesurent au moins 80 cm ([Arrêté n°2013-5792](#) ; [Philippe, 2013](#)). Selon les données de la Chambre Syndicale des Algues, 285,0, 86,0 et 60,0 T d'himanthales ont été récoltées dans toute la Bretagne en 2008, 2009 et 2010 respectivement ([Figure 1-16](#)) ([Mesnildrey et al., 2012](#)).

Selon les données déclaratives fournies par les récoltants au CRPMEM, 107,3 et 203,6 T d'*H. elongata* ont été récoltées dans le Finistère en 2015 et 2016 respectivement, soit 4 et 8% de la récolte départementale. Dans les Côtes d'Armor, la récolte est plus anecdotique avec 35 et 160 kg récoltés en 2015 et 2016 respectivement.

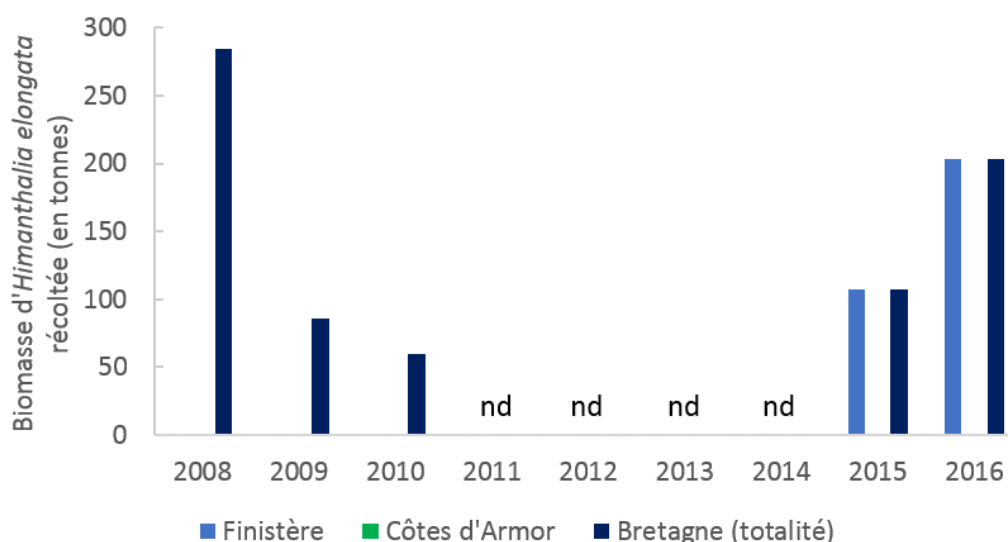


Figure 1-16 : Biomasse d'*Himanthalia elongata* récoltée entre 2008 et 2016 dans les départements du Finistère et des Côtes d'Armor ainsi que dans toute la Bretagne selon le CRPMEM et [Mesnildrey et al. \(2012\)](#). nd = Absence de données en 2011, 2012, 2013 et 2014.

4.1.5.3 Valorisation

Elle fait partie de la liste des algues comestibles en France (CEVA, 2011). Cox et al. (2010), Plaza et al. (2010b), Rodríguez-Bernaldo de Quirós et al. (2010) et Rajauria et al. (2012) ont montré des activités antioxydante et antimicrobienne à partir d'un extrait aqueux, méthanolique, éthanolique ou à l'acétone. L'étude de Quéguineur et al. (2013) a confirmé la capacité antioxydante d'un extrait méthanolique riche en composés phénoliques. Par ailleurs, Santoyo et al. (2011) a montré une activité anti-virale grâce à un extrait aqueux, éthanolique ou à l'hexane. Lamela et al. (1989) ont montré une activité hypoglycémique par administration orale d'un extrait éthanolique chez des lapins. Cette algue est valorisée dans le domaine de la cosmétique comme le montre l'actif Firm'act de Gelyma (France, <http://www.gelyma.com/>) contenant un extrait aqueux d'*H. elongata* apportant ses propriétés hydratantes au produit.

4.1.5.4 Composés phénoliques d'*H. elongata*

Les teneurs en CP d'*H. elongata* retrouvées dans la littérature peuvent aller jusqu'à 2,2% du poids sec de l'algue pour un extrait hydrométhanolique (Connan, 2004) ou encore 19,8% de l'extrait sec pour un extrait hydroéthanolique (Heffernan et al., 2015b). Heffernan et al. (2015b) ont mis en évidence la présence de phlorotannins de faible poids moléculaire compris entre DP 7 et 12. Un des phlorotannins les plus abondants serait celui avec un DP de 9, suivi de ceux avec des DP de 10, 11 et 12. Glombitza & Große-Damhue (1984) ont réussi à mettre en évidence les phlorotannins de l'himanthale : des difucophloretols, fucodiphloretols, fucotetrphloretols ou des fucotriphloretols.

4.1.6 *Alaria esculenta* (Linnaeus) Greville

4.1.6.1 Description

Cette algue annuelle se présente sous la forme d'un long thalle ondulé membraneux de couleur olive ou brun-jaune et aplati non ramifié pouvant atteindre 4 m de long (Figure 1-17). La base possède un court stipe qui peut porter plusieurs sporophylles portant eux-même les spores. Son aire de répartition se situe en Atlantique Nord-Est et Nord-Ouest ainsi que dans le Pacifique Nord, au Japon, Corée et Kamchatka. En Bretagne, elle est retrouvée sur l'estran au niveau de l'étage infralittoral en mode battu et dans les mares du bas de certains estrans battus. Parfois, elle forme une ceinture au-dessus de *Laminaria digitata* (Cabioc'h et al., 2014). Le cycle d'*A. esculenta* est digénétique haplodiplophasique, soit le cycle classique des Laminaires (cf. pages 13-14).

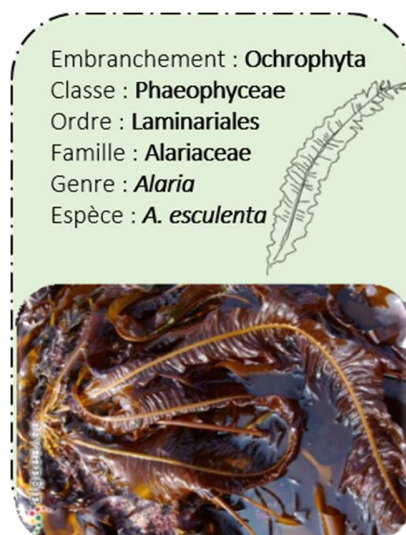


Figure 1-17 : Classification d'*Alaria esculenta* (Linnaeus) Greville.
Photo ©M.D. Guiry

4.1.6.2 Biomasse et récolte en Bretagne

C'est une algue cultivée pour une valorisation majoritairement alimentaire.

4.1.6.3 Valorisation

Alaria esculenta est pauvre en alginate et est plutôt appréciée pour sa très bonne qualité alimentaire (Garineaud, 2017). Des extraits aqueux ou à l'acétone ont montré des activités antioxydantes (Wang et al., 2009). Un autre extrait hydroalcoolique obtenu par Coşoveanu et al. (2000) a montré des activités antifongiques intéressantes pour être utilisé en agriculture. Par ailleurs, Nwosu et al. (2011) ont montré que des fractions purifiées au chloroforme ou à l'eau d'*A. esculenta* possèdent une activité antiproliférative contre les cellules du cancer du poumon ainsi qu'une activité antidiabétique par l'inhibition de l'enzyme α -amylase. Une activité anti-tumorale a également été détectée pour des extraits au méthanol et au dichlorométhane (Zubia et al., 2009). L'algue est valorisée dans le domaine de la cosmétique comme le montre l'observatoire des cosmétiques, CosmeticOBS, qui recense les produits intégrant l'ingrédient « extrait de l'algue *Alaria esculenta* » (<https://cosmeticobs.com/fr/ingredient-cosmetique/alaria-esculenta-extract-1381/>). Par exemple, un extrait d'*A. esculenta* riche en polyphénols, mannitol, acides gras et oligo-éléments est utilisé pour ses propriétés anti-âge dans l'actif l'Exsymtal® de Exsymol (Monaco, <https://www.exsymol.com/fr/>) (Stiger-Pouvreau & Guérard, 2018).

4.1.6.4 Composés phénoliques d'*A. esculenta*

Les CP chez *A. esculenta* peuvent atteindre jusqu'à 2% du poids sec de l'algue pour un extrait méthanol/dichlorométhane (Zubia et al., 2009). A ma connaissance, aucune étude n'a identifié les phlorotannins présents chez cette algue. Des difucols sulphates ont été identifiés chez une autre Alariaceae, *Pleurophycus gardneri* (Martínez & Castañeda, 2013).

4.1.7 *Laminaria ochroleuca* Bachelot de la Pylae

4.1.7.1 Description

Cette algue pérenne, aussi appelée laminaire jaune, possède un stipe de couleur brun clair et cylindro-conique, lisse, flexible et gluant allant jusqu'à 2 m avec une fronde découpée en lanières (Figure 1-18). Son aire de répartition se situe entre la Manche, l'Atlantique Nord-Est et la Méditerranée. Elle se situe en milieu infralittoral, en-dessous des autres laminaires et est pratiquement tout le temps immergée, sauf aux marées d'équinoxe. Sa période de fertilité se situe entre le milieu de l'été et jusqu'à l'automne. Le cycle de *L. ochroleuca* est digénétique haplodiplophasique, soit le cycle classique des Laminaires (cf. pages 13-14).

4.1.7.2 Biomasse et récolte en Bretagne

Connan (2004) a montré une plus forte biomasse de *L. ochroleuca* en

été et plus faible en hiver à Portsall. D'après le Rebent, une diminution de la densité des grandes laminaires dont *L. ochroleuca* est observée en Bretagne (Derrien-Courtel et al., 2000). En effet, la laminaire jaune régresse sur le site des Îles de la Croix à l'Aber Wrac'h. Elle est parfois récoltée de façon involontaire par les goémoniers en récoltant les autres laminaires. Elle est occasionnellement recherchée par des récoltants à pied (Garineaud, 2017). En Bretagne, elle fait partie des algues cultivées sur filières en mer.

4.1.7.3 Valorisation

C'est une algue également récoltée pour ses diverses propriétés à visées pharmaceutiques, alimentaires, cosmétiques, ou industrielles. Selon Łęska et al., (2018), c'est une laminaire souvent utilisée en cosmétique dans des crèmes pour ses activités hydratante, anti-âge et anti-acné, dans des masques ou encore des shampoings. Gelyma (France, <http://www.gelyma.com/>) commercialise un actif Ocea Defense® comprenant un extrait de *L. ochroleuca* en tant que booster immunitaire. L'observatoire des cosmétiques liste les différents produits cosmétiques utilisant cet ingrédient « Extrait d'algue *Laminaria ochroleuca* » (<https://cosmeticobs.com/fr/ingredient-cosmetique/laminaria-ochroleuca-extract-152/>). Un extrait huileux de cette algue permettrait de protéger la peau contre les réactions photoallergiques et active le métabolisme cellulaire (Łęska et al., 2018). Par ailleurs, Boujaber et al. (2017) ont mis en évidence une activité anti-inflammatoire et anti-cancer, anti-élastase (anti-âge) grâce à un extrait dichlorométhane/méthanol. Une activité hypoglycémique a également été démontrée par Lamela et al. (1989) par administration orale d'un extrait éthanolique chez des lapins.

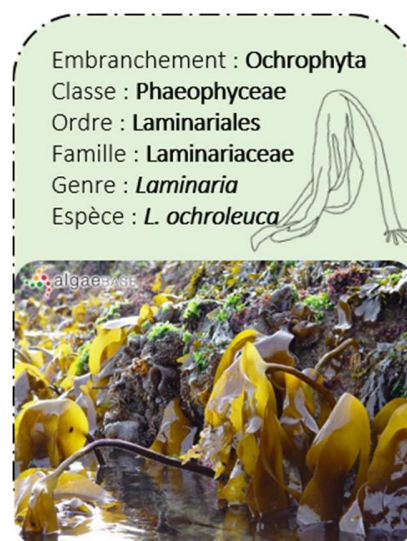


Figure 1-18: Classification de *Laminaria ochroleuca* Bachelot de la Pylae. Photo © I. Bárbara

4.1.7.4 Composés phénoliques de *L. ochroleuca*

Les teneurs en CP retrouvées chez *L. ochroleuca* peuvent atteindre jusqu'à 7,3 g équivalent phloroglucinol/kg du poids sec pour un extrait hydrométhanolique (Jiménez-Escrig et al., 2001). Koch et al. (1980) ont mis en évidence la présence de dérivés acétylés de faible poids moléculaire : tetraphlorethol-A-nonacetate, fucophlorethol-B-octacetate, fucodiphlorethol-C-decacetate, pentafuhaloltridecacetate et heptafuhaloloctadecacetate.

4.1.8 *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar

4.1.8.1 Description

Cette algue annuelle atteignant jusqu'à 3 m, appelée wakamé au Japon, possède un stipe aplati qui traverse la lame mince en forme de feuille de couleur brun-jaunâtre (Cabioch et al., 2006) (Figure 1-19). Le stipe est épais et plat avec à sa base des sporophylles qui contiennent les structures fertiles. Son aire de répartition est très répandue du fait que cette algue a été introduite dans de nombreux pays pour l'aquaculture mais aussi par le transport maritime pour l'Hémisphère Sud (Voisin et al., 2007). Elle est originaire de l'Océan Pacifique tempéré, et est présente dans l'Océan Indien Sud-Est tempéré, la Méditerranée et l'Atlantique Nord et Sud tempéré. Elle a été introduite en France mais aussi dans l'Hémisphère Sud en Nouvelle Zélande, Tasmanie et Australie (Grulois, 2010). Elle se trouve dans la partie supérieure de l'étage infralittoral, près du zéro des cartes marines, et elle est trouvée dans les zones abritées tels que les ports. Son cycle de vie est digénétique hétéromorphe, comme le cycle de *Saccharina japonica* (cf. pages 13-14). Les spores sont émises dans l'eau à la fin du printemps ou début d'été. Il y a formation d'un sporophyte qui se développe sur 5 à 6 mois entre l'automne et l'été.

4.1.8.2 Biomasse et récolte en Bretagne

Cette algue possède une très forte valeur commerciale en Asie. Environ 2 millions de tonnes sont produites dans le monde, avec la Chine, la Corée et le Japon comme principaux producteurs (FAO, 2018). La récolte se fait minoritairement sur des algues sauvages mais surtout à partir d'algues cultivées. Elle fait aussi l'objet de culture en mer sur les côtes bretonnes (Pérez et al., 1990).



Figure 1-19: Classification d'*Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar.
Photo ©M.D. Guiry

4.1.8.3 Valorisation

Elle est très utilisée en alimentation dans les soupes et salades. Différents extraits ont montré des activités antioxydantes : un extrait enzymatique (Je et al., 2009), un extrait à l'acétone (Rodríguez-Bernaldo de Quirós et al., 2010) ou encore un extrait méthanolique et une fraction méthanolique purifiée enrichie en composés phénolique purifiées (Onofrejová et al., 2010). Cette algue est utilisée en cosmétique comme le montre l'observatoire des cosmétiques qui recense les différents produits intégrant l'ingrédient « Extrait de l'algue *Undaria pinnatifida* » (<https://cosmeticobs.com/fr/ingredient-cosmetique/undaria-pinnatifida-extract-915/>). Des galactofucanes sulfatés d'*U. pinnatifida* présents dans l'extrait Matrigenics 14G de Codif Technologie Naturelle (France, <http://www.codif-tn.com/>) sont utilisés pour leurs propriétés d'accélération de la synthèse, la maturation et l'organisation des fibres de collagène et d'élastine de la peau et leur propriété anti-âge (Stiger-Pouvreau & Guérard, 2018). Un extrait huileux de gamétophytes d'*U. pinnatifida* est commercialisé sous le nom d'Ephemer™ par BiotechMarine (SEPPIC, France, <https://www.seppic.com/fr/seppic/biotechmarine>), utilisé pour traiter les troubles du cuir chevelu et réguler la sécrétion séborrhéique (Stiger-Pouvreau & Guérard, 2018). Des fucoïdanes d'extrait d'*U. pinnatifida* ont montré des activités anti-tumorales (Synytsya et al., 2010 ; Vishchuk et al., 2011) mais aussi anti-viral contre le virus de l'herpès et le cytomegalovirus (Lee et al., 2004) ou encore anti-angiogénique (Aisa et al., 2005 ; Sugawara et al., 2006). Par ailleurs, un fucostérol d'*U. pinnatifida* a montré une activité anti-inflammatoire (Yoo et al., 2012).

4.1.8.4 Composés phénoliques d'*U. pinnatifida*

Les CP chez *U. pinnatifida* peuvent atteindre des teneurs allant jusqu'à 6,6 g équivalent phloroglucinol/kg du poids sec d'algues (Jiménez-Escrig et al., 2001). Aucune étude n'a identifié les phlorotannins présents chez cette algue. Des difucols sulfates ont été identifiés chez une autre Alariaceae, *Pleurophycus gardneri* (Martínez et al., 2013).

4.1.9 *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye

4.1.9.1 Description

Cette algue constituée de filaments ramifiés, mesure de quelques centimètres jusqu'à 20 cm maximum (Figure 1-20). Son aire de répartition se situe dans toutes les régions tempérées du monde. Elle se retrouve sur divers substrats durs près de la laisse de marée basse ou plus bas et est également épiphyte sur d'autres algues. Charrier et al. (2008) décrivent les recherches des deux derniers siècles sur le développement et la physiologie d'*Ectocarpus siliculosus* dont le cycle de vie est décrit dans ce Chapitre (cf. pages 14-15). Elle a été proposée comme organisme modèle de séquençage du génome et de génétique pour les algues brunes (Charrier et al., 2008). Montecinos (2016) a montré qu'il existe en fait un complexe d'espèces avec aussi *E. crouaniorum* et *E. fasciculatus*.

Embranchement : Ochrophyta
Classe : Phaeophyceae
Ordre : Ectocarpales
Famille : Ectocarpaceae
Genre : *Ectocarpus*
Espèce : *E. siliculosus*



Figure 1-20: Classification d'*Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye. Photo ©D. Littler

4.1.9.2 Biomasse et récolte en Bretagne

Aucune récolte en Bretagne n'est constatée si ce n'est pour la recherche scientifique, à la Station Biologique de Roscoff où cette espèce est également cultivée en laboratoire.

4.1.9.3 Valorisation

C'est une algue qui est à l'heure actuelle peu valorisée en industrie. Quelques publications scientifiques montrent des activités biologiques tout de même prometteuses pour être valorisées. Par exemple, un extrait diethyl ether a montré une activité anti-microbienne (Tüney et al., 2006). Par ailleurs, des extraits aqueux, éthanoliques ou au dichlorométhane ont montré une activité anti-fouling contre des bactéries marines et des larves de balanes (Hellio et al., 2004).

4.1.9.4 Composés phénoliques d'*E. siliculosus*

Les teneurs en CP retrouvées chez *E. siliculosus* peuvent atteindre entre 250 et 400 μmol équivalent phloroglucinol/ g de matière fraîche d'algues pour un extrait aqueux (Sáez et al., 2014). C'est chez cette espèce que l'étape clé de la fabrication des phlorotannins chez les algues brunes, a été mise en évidence, avec le mécanisme original d'une enzyme, la polyketide synthase de type III (PKS III), impliquée dans la voie de biosynthèse de ces composés à finalité commerciale (Meslet-Cladière et al., 2013 ; Delage et al., 2011). D'après cette étude, nous savons donc qu'*E. siliculosus* synthétise du phloroglucinol mais aucune étude n'a encore été identifiée la présence d'autres phlorotannins.

4.2 Récolte et séchage des macroalgues utilisées dans ce projet

La Bretagne a été quadrillée en secteurs, appelés carroyages, dans lesquels les récoltants cueillent leur biomasse algale (Chambre Syndicale des Algues, <http://www.chambre-syndicale-algues.org/?Actualit%26acute%3B>) (Figure 1-21).

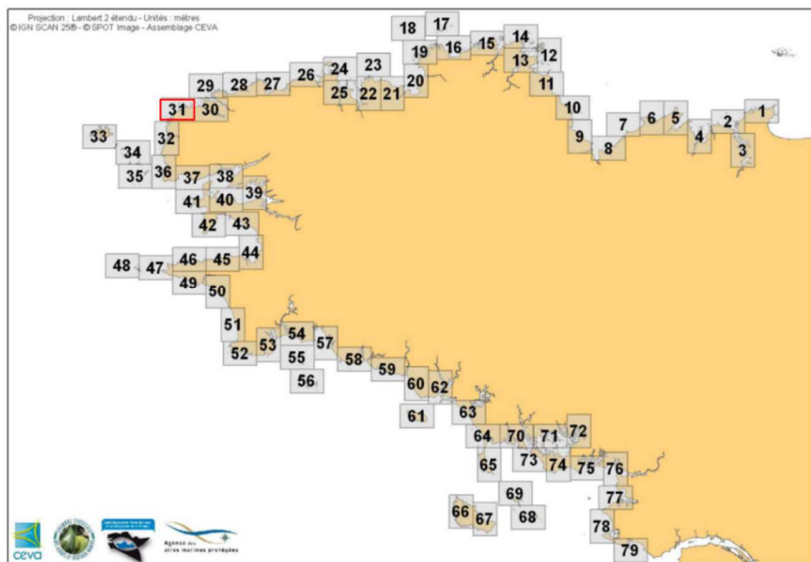


Figure 1-21 : Carte de la Bretagne avec les carroyages pour la récolte des algues. Le carroyage numéro 31 a été entouré en rouge puisque 4 macroalgues brunes ont été récoltées dans cette zone (modifiée d'après Chambre Syndicale des Algues, <http://www.chambre-syndicale-algues.org/images/file/recolte-a-pied/carroyage-a3.pdf>).

Dans le cadre du projet RIV-AGE2.0, *Alaria esculenta*, *Bifurcaria bifurcata*, *Halidrys siliquosa* et *Laminaria ochroleuca* ont été récoltées dans le Finistère dans le carroyage numéro 31 tandis qu'*Ascophyllum nodosum* et *Himanthalia elongata* ont été récoltées dans les Côtes d'Armor et *Fucus serratus* à Saint-Malo en Ile-et-Vilaine. Ces différentes espèces ont été récoltées à l'état sauvage (Figure 1-22), et ont été sélectionnées puisqu'elles constituent d'importantes biomasses en Bretagne, ce qui est indispensable pour pouvoir les valoriser à grande échelle. Ces espèces ont été récoltées manuellement et immédiatement séchées selon le protocole suivant : séchage à basse température (maximum 30°C) sur peignes ou claies 2 à 3 h après la récolte et à l'obscurité. Les algues ont également été pré-broyées à l'aide d'un broyeur inox. En parallèle, trois espèces de macroalgues ont été cultivées en « free living » : *Undaria pinnatifida*, *Alaria esculenta* et *Ectocarpus siliculosus* (voir Encart 1, Figure 1-22).

Récolte à l'état sauvage



Culture en « free-living »

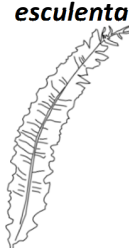






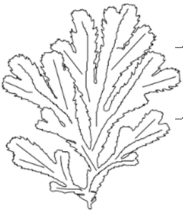
Figure 1-22 : Macroalgues brunes utilisées lors de cette étude soit récoltées à l'état sauvage (à gauche), soit cultivées en "free-living" (à droite). Ae = *Alaria esculenta*, An = *Ascophyllum nodosum*, Bb = *Bifurcaria bifurcata*, Es = *Ectocarpus siliculosus*, Fs = *Fucus serratus*, Hs = *Halidrys siliquosa*, He = *Himanthalia elongata*, Lo = *Laminaria ochroleuca*, Up = *Undaria pinnatifida*





4.3 Bilan des teneurs et types de composés phénoliques dans les modèles étudiés

Le **Tableau 1-2** résume les différentes teneurs en composés phénoliques des neuf espèces étudiées après des étapes d'extraction, voire de purification selon les travaux publiés dans la littérature. Ce sont les Fucales qui présentent des teneurs en CP les plus importantes avec notamment *A. nodosum* et *F. serratus*. La Sargassaceae *H. siliquosa* montre également des teneurs très élevées comme l'ont démontré [Stiger-Pouvreau et al. \(2014\)](#) comparativement à d'autres Sargassaceae bretonnes (*Cystoseria tamariscifolia*, *C. baccata*, *C. nodicaulis*, *C. humilis*, *C. foeniculacea* et *Sargassum muticum*).

Tableau 1-2 : Teneurs en composés phénoliques des macroalgues brunes étudiées et littérature associée. ED : eau distillée, MetOH : méthanol, DCM : dichlorométhane, ACT : acétone, AE : acétate d'éthyle, EtOH : éthanol, CHF : chloroforme, HEX : hexane, F-C : dosage du Folin-Ciocalteu, MS : masse sèche d'algues, MH : masse humide d'algues, ES : extrait sec, EH : extrait humide.

Algues	Procédés d'extraction et/ou de purification	Teneurs en CP	Références scientifiques
 <i>Alaria esculenta</i>	Macération MetOH 100%	9,6% MS éq. phloroglucinol (F-C)	Zhang et al., 2006
	Extraction Accélérée par Solvant DCM/MetOH (1:1, v/v)	2,0% MS (F-C)	Zubia et al., 2009
	Macération à l'acétonitrile/ED/acide formique (50:49,8:0,2, v/v/v)	0,9% MS (F-C)	Schiener et al., 2014
	Macération ACT/ED (80:20, v/v)	Entre 2,6 et 3,4 g éq. phloroglucinol/100 g ES (F-C)	Stévant et al., 2017
	Macération ACT/ED	Entre 9 et 14% MS (dosages Folin-Denis et Bretamine)	Ragan & Jensen, 1978
 <i>Ascophyllum nodosum</i>	Macération MetOH/ED (1:1, v/v)	Entre 3,7 et 13,1% MS (Folin-Denis)	Pavia & Åberg, 1996
	Macération MetOH/ED (1:1, v/v)	39,0% MS éq. phloroglucinol (F-C)	Zhang et al., 2006
	Macération MetOH/ED (v/v)	Entre 6 et 8% MS (F-C)	Connan et al., 2004 ; 2007
	Macération ACT/ED (7:3, v/v)	15,9 g éq. phloroglucinol/100 g ES (F-C)	Wang et al., 2009
	Macération 100% MetOH Macération MetOH/ED (1:1, v/v) Purification liquide/liquide (HEX, DCM, AE) Ultrafiltration 50 kDa Ultrafiltration 2 kDa	21,2 ; 15,4 ; 77,4 ; 89,7 ; 23,0% ES (F-C)	Audibert et al., 2010
Macération MetOH/ED (1:1, v/v) Purification liquide/liquide (HEX, DCM, AE)	39,7 ; 62,3 ; 65,5 ; 33,5% par g ES (F-C)	Blanc et al., 2010	

	Ultrafiltration 50 kDa puis Ultrafiltration 2 kDa		
	Macération ACT	10,68 g éq. phloroglucinol/kg ES	Guinea et al., 2012
	Macération MetOH/ED (1:1, v/v)	Jusqu'à 3,84% MS	Tanniou, 2014
	Macération ED	0,96 g éq. phloroglucinol/100 g d'extrait (F-C)	Agregán et al., 2017a
	Macération EtOH/ED (1:1, v/v) aux ultrasons	18,0 g éq. phloroglucinol/100 g ES ou 4,7 g éq. phloroglucinol/ 100 g MS (F-C)	Agregán et al., 2018
	Macération MetOH/ED (1:1, v/v)	3,7% MS (F-C)	Connan et al., 2004 ; 2007
<i>Bifurcaria bifurcata</i> 	Macération MetOH/ED (1:1, v/v)	Entre 1,5 et 4,5% MS (F-C) Entre 0,2 et 0,4% MS (F-C)	Le Lann et al., 2008 ; 2012a
	Extraction Accélérée par Solvant DCM/MetOH (1:1, v/v)	1,0% MS (F-C)	Zubia et al., 2009
	Purification liquide/liquide (EtOH, ACT, DCM, AE)	~4% MS (F-C)	Stiger-Pouvreau et al., 2014
	Macération MetOH	220,0 mg éq. phloroglucinol/g ES (F- C)	Alves et al., 2016
	Macération ED	1,99 g éq. phloroglucinol/100 g ES (F-C)	Agregán et al., 2017a
	Macération EtOH/ED (1:1, v/v) aux ultrasons	16,0 g éq. phloroglucinol/100 g ES ou 5,7 g éq. phloroglucinol/ 100 g MS (F-C)	Agregán et al., 2018
<i>Ectocarpus siliculosus</i> 	Macération MetOH/CHF (2:1, v/v) aux ultrasons	0,87% MS éq. acide gallique	Zhang et al., 2007
	Macération ED	Entre 250 et 400 µmol phloroglucinol/g de MF (F-C)	Sáez et al., 2015
<i>Fucus serratus</i> 	Macération MetOH/ED (1:1, v/v)	4,3% MS (F-C)	Connan et al., 2004
	Macération ACT/ED (7:3, v/v)	24,0 g éq. phloroglucinol/100 g ES (F-C)	Wang et al., 2009
	Extraction Accélérée par Solvant DCM/MetOH (1:1, v/v)	2,8% MS (F-C)	Zubia et al., 2009
	Macération MetOH/ED (7:3, v/v)	80,7 ; 76,0 ; 81,9 µg	Heffernan et al., 2015a
	Macération EtOH/ED (8:2, v/v) Macération ED	éq. acide gallique/mg ES (F-C)	

	Macération EtOH/ED (8:2, v/v)	180,6 µg éq. phloroglucinol/mg ES (F-C)	Heffernan et al., 2015b
<i>Halidrys siliquosa</i> 	Extraction Accélérée par Solvant DCM/MetOH (1:1, v/v)	1,6% MS (F-C)	Zubia et al., 2009
	Purification liquide/liquide (EtOH, ACT, DCM, AE)	17,7% MS (F-C)	Stiger-Pouveau et al., 2014
	Macération EtOH/ED (1:1, v/v) Purification liquide/liquide (EtOH, ACT, DCM, AE)	182,5 et 975,7 mg/g ES	Le Lann et al., 2016
<i>Himanthalia elongata</i> 	Macération MetOH/ED (1:1, v/v)	2,2% MS (F-C)	Connan et al., 2004
	Macération MetOH/ED (6:4, v/v)	151,3 mg éq. acide gallique/g ES (F-C)	Cox et al., 2010
	Macération ACT/ED (7:3, v/v)	10,0 g éq. phloroglucinol/kg EH (F-C)	Rodríguez-Bernaldo de Quirós et al., 2010
	Macération MetOH/ED (6:4, v/v)	286,0 mg éq. acide gallique/g ES (F-C)	Rajauria et al., 2012
	Macération EtOH/ED (8:2, v/v)	198,3 µg éq. phloroglucinol/mg ES (F-C)	Heffernan et al., 2015b
	Macération EtOH/ED (6:4, v/v)	548,3 mg éq. acide gallique/g MS (F-C)	Belda et al., 2016
<i>Laminaria ochroleuca</i> 	Macération MetOH/ED (1:1, v/v)	18 mg éq. acide gallique/g MS (F-C)	Fernández-Segovia et al., 2018
	Macération MetOH/ED (1:1, v/v)	7,3 g éq. phloroglucinol/kg MS (F-C)	Jiménez-Escrig et al., 2001
	Macération MetOH/ED (1:1, v/v)	1,7 mg éq. acide gallique/g MS (F-C)	Fernández-Segovia et al., 2018
<i>Undaria pinnatifida</i> 	Macération MetOH/ED (1:1, v/v)	6,6 g éq. phloroglucinol/kg MS (F-C)	Jiménez-Escrig et al., 2001
	Extraction au fluide supercritique à 200, 250 et 300 bar	Entre 350 et 800 µg/g (F-C)	Roh et al., 2008
	Macération ACT/ED (7:3, v/v)	6,0 g éq. phloroglucinol/kg EH (F-C)	Rodríguez-Bernaldo de Quirós et al., 2010
	Extraction Accélérée par Solvant MetOH/ED (8:2, v/v) + séparation en phase solide (MetOH)	≈ 20 µmol éq. acide gallique/g (F-C)	Onofrejová et al., 2010
	Macération ACT	2,38 g éq. phloroglucinol / kg ES	Guinea et al., 2012
	Macération MetOH/ED (1:1, v/v)	2,6 mg éq. acide gallique/g MS (F-C)	Fernández-Segovia et al., 2018
	Macération MetOH/ED (1:1, v/v)	0,04 à 0,18% MS	Stiger-Pouveau, Com. Pers.

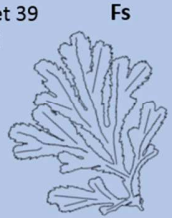
Certains auteurs ont réussi à déterminer les structures chimiques des phlorotannins chez certaines espèces de macroalgues. Ces principales structures sont répertoriées dans la [Figure 1-23](#). Dans cette figure, les algues ont été rangées par ordre et par famille. Ainsi, nous pouvons observer la diversité des phlorotannins des algues brunes.

Fucales

Fucaceae



An Phlorotannins avec DP entre 1 et 39
Dimère de phloroglucinol C-O-C
Hydroxyfuhalol A
Difuco
Tetrafuco
Diphlorethol
Fucodiphlorethol
7-hydroxyeckol



Fs
Phlorotannins avec DP entre 3 et 16

Nwosu et al., 2010; Steevens et al., 2012; Tierney et al., 2013, 2014; Corona et al., 2016

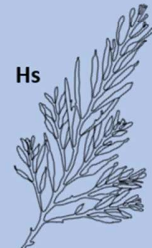
Heffernan et al., 2015

Sargassaceae



Bb
Fuhalols

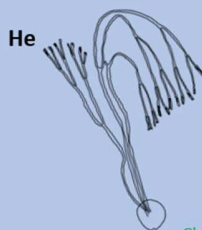
Glombitza & Rösener, 1974; Koch et al., 1981; Stiger-Pouvreau et al. 2014



Hs
Trifuhalol
Tetrafuhalol
Diphlorethol
Triphlorethol

Stiger-Pouvreau et al., 2014; Le Lann et al., 2016

Himanthaliaceae

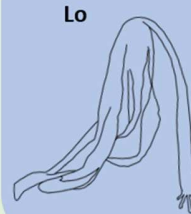


He Phlorotannins avec DP entre 7 et 12
Difucophlorethol A
Fucodiphlorethol
Fucotetraphlorethol A + B
Fucotriphlorethol C

Glombitza & Große-Damhues, 1984, Heffernan et al., 2015

Laminariales

Laminariaceae



Lo
Triphlorethol C
Tetraphlorethol A nonacetate
Fucophlorethol B octacetate
Fucodiphlorethol C decacetate
Pentafuhaloltridecacetate
Heptafuhalol octadecacetate
Monochlorotriphlorethol C

Glombitza et al., 1977; Koch et al., 1980; Martínez et al. 2013; Kornprobst, 2014

Alariaceae



Up



Ae

Fucols ?

Martínez et al., 2013

Ectocarpales

Ectocarpaceae



Es

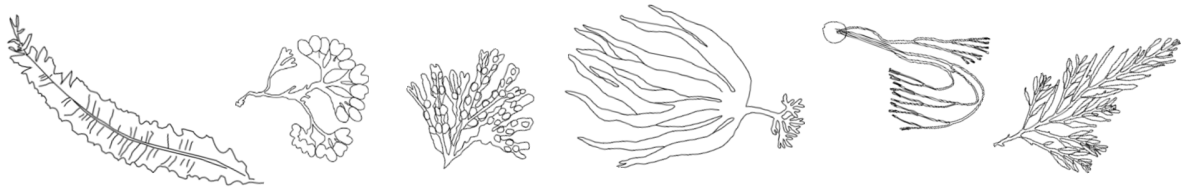
Phloroglucinol

Meslet-Cladière et al. 2013

Figure 1-23 : Type de phlorotannins retrouvés chez les macroalgues brunes étudiées. An : *Ascophyllum nodosum*, Fs : *Fucus serratus*, Bb : *Bifurcaria bifurcata*, Hs : *Halidrys siliquosa*, He : *Himanthalia elongata*, Lo: *Laminaria ochroleuca*, Up: *Undaria pinnatifida*, Ae: *Alaria esculenta*, Es : *Ectocarpus siliculosus*, DP = degré de polymérisation



Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale



1 Introduction

Pour être isolés, certains métabolites tels que les composés phénoliques nécessitent de nombreuses étapes de séparation et de purification, souvent longues et coûteuses. La première étape pour obtenir ces molécules est l'extraction à partir de la matière algale (Figure 2-1). Souvent celle-ci n'est pas suffisante pour obtenir un extrait enrichi en molécules souhaitées et une étape d'isolement de ces composés par des procédés de purification ou semi-purification est nécessaire. Enfin, la dernière étape consiste à élucider la structure des molécules cibles. De manière générale, s'ils sont nombreux, ces processus freinent leur développement industriel. Les techniques classiques d'extraction telles que l'extraction solide/liquide (macération) peuvent générer la plupart du temps des déchets dangereux et demander beaucoup d'énergie. Il est donc nécessaire de prospecter et rechercher de nouveaux procédés éco-responsables et efficaces pour optimiser la performance, le temps et le coût d'extraction (Esquivel-Hernández et al., 2017).

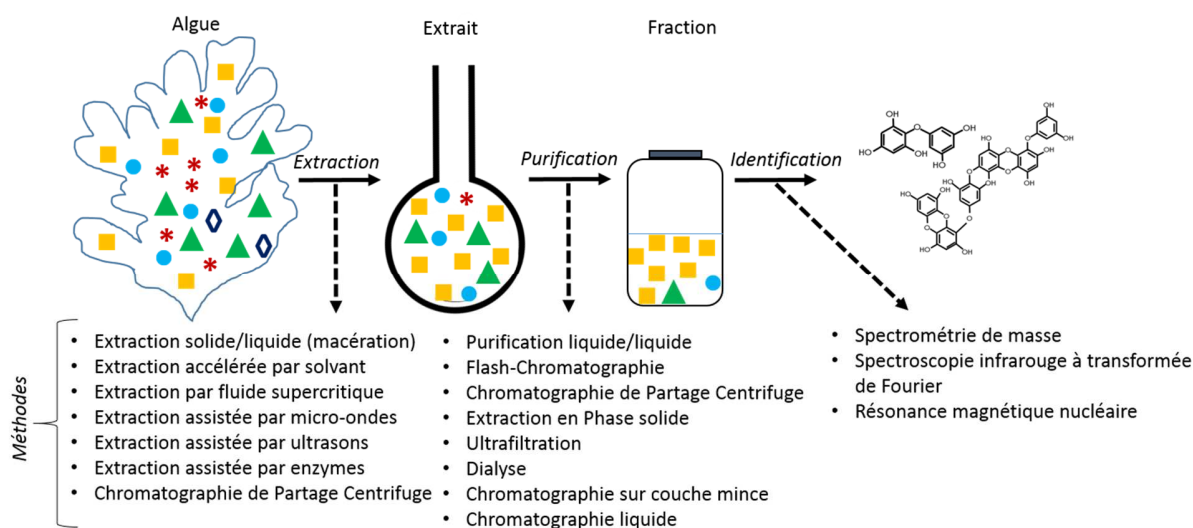


Figure 2-1 : De l'algue à la fraction : méthodes permettant d'obtenir des fractions enrichies en composés phénoliques identifiés (Le Lann et al., 2012a ; Steevensz et al., 2012 ; Hardouin et al., 2014 ; Stiger-Pouvreau et al., 2014 ; Tanniou et al., 2013 ; Esquivel-Hernández et al., 2017 ; Vissers et al., 2017 ; Cikoš et al., 2018 ; Creis et al., 2018 ; Gallego et al., 2018 ; Gonçalves-Fernández et al., 2019).

Une solution possible est la chimie verte. L'« extraction verte » selon Chemat et al. (2012) « est basée sur la découverte et le design d'un procédé d'extraction qui réduit la consommation d'énergie, autorise l'utilisation de solvants alternatifs et de produits naturels renouvelables ainsi que l'assurance d'un extrait/produit sain et de haute qualité ». Toujours selon Chemat et al. (2012), six principes de l'extraction verte des produits naturels peuvent être pris en considération comme une orientation vers une norme innovante et écologique (Figure 2-2). En effet, les industriels recherchent des méthodes de plus en plus éco-responsables dans le but de diminuer leur impact sur l'environnement, ils cherchent également à être innovant dans la compétitivité du marché (Chemat et al., 2012, 2019). Le schéma européen a déjà

radicalement changé, par la mise en place de la directive REACH (Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of Chemicals) qui vise à enregistrer les substances chimiques utilisées dans l'industrie et dans les produits de consommation courante dans le but d'éliminer les substances responsables de différentes pathologies (Règlement CE N° 1907/2006). D'autre part, la directive IPPC (Integrated Pollution Prevention Control) vise à minimiser la pollution émanant de différentes sources industrielles en réduisant la contribution des industries au développement non durable (Directive 2008/1/CE).

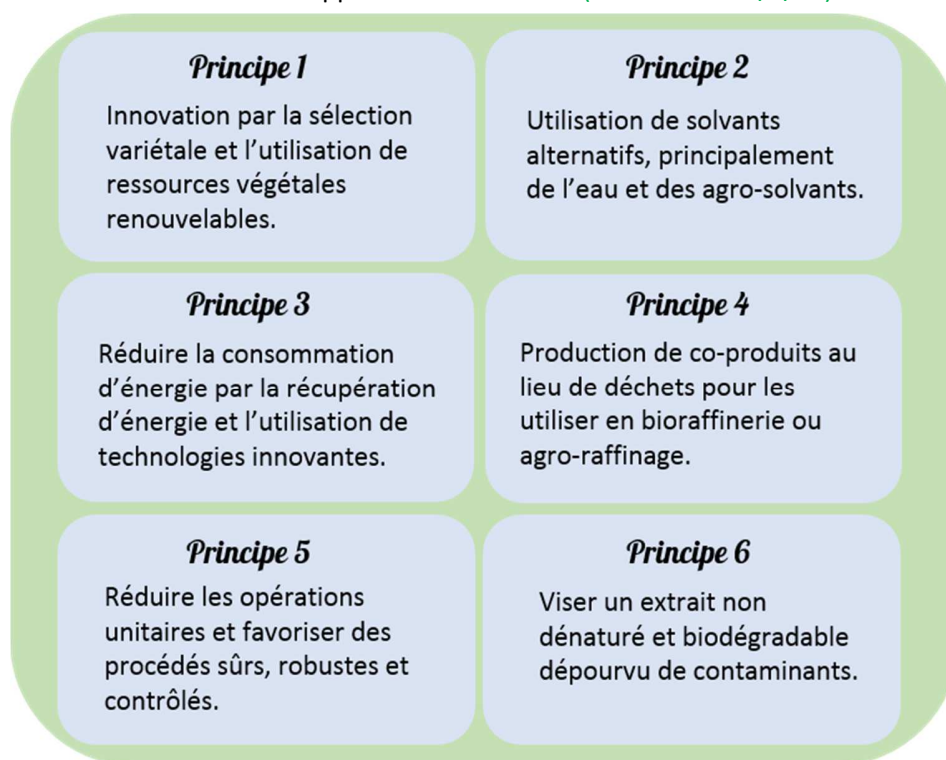


Figure 2-2 : Les six principes de l'extraction verte pour obtenir des substances naturelles, selon Chemat et al. (2012).

La méthode d'extraction classique correspond à la macération : c'est la méthode la plus utilisée consistant à mettre en contact la poudre végétale avec un solvant ou un mélange de solvant. De nombreuses possibilités existent pour cette méthode, en faisant varier les temps de macération, la température ou encore le type de solvant (Stiger-Pouvreau et al., 2014 ; Creis et al., 2018). Cependant, cette méthode présente plusieurs limites telles que des rendements et un degré de pureté faibles ainsi qu'une forte consommation de solvants et de longs temps de traitement. Elle nous servira de référence dans notre étude pour estimer l'efficacité des autres méthodes d'extraction testées. D'autres méthodes existent permettant de diminuer la consommation de solvant ou encore l'énergie nécessaire au procédé. C'est le cas par exemple de l'extraction accélérée par solvant, par fluide supercritique, assistée par enzymes, ultrasons ou micro-ondes ou encore la chromatographie de partage centrifuge (Figure 2-1).

L'extraction accélérée par solvant (ASE), appelée aussi extraction par fluide pressurisé (PLE) est une technologie verte semi-automatisée qui a été introduite dans les années 1990 et qui utilise le principe basique d'une extraction solide/liquide traditionnelle mais sous haute pression et haute température (Richter et al., 1996). L'ASE est considérée comme une extraction verte puisqu'elle est plus rapide grâce à son automatisation et la possibilité de passer plusieurs échantillons selon le type d'ASE. De plus, elle utilise de petites quantités de solvant dont le choix est large, ce qui permet de remplacer les solvants dangereux par des solvants plus sains pour l'environnement comme l'eau, l'éthanol ou le limonène (Prat et al., 2016). De plus, cette technique peut être utilisée à l'échelle industrielle (Pronyk & Mazza, 2009). Cette technologie a fait ses preuves dans l'extraction des composés phénoliques de macroalgues brunes (Zubia et al., 2009 ; Tanniou et al., 2013 ; Tierney et al., 2013b ; Pilar Sánchez-Camargo et al., 2016). Un inconvénient principal est que cette méthode est généraliste, c'est-à-dire que l'ASE peut extraire un large panel de molécules simultanément et est donc une méthode peu sélective avec la nécessité de rajouter une méthode de semi-purification ou purification à la suite.

Afin d'obtenir des extraits enrichis, une méthode de purification peut être mise en place à la suite de la macération, c'est la purification liquide/liquide (LL). Cette technique implique des lavages successifs avec différents solvants et permet ainsi d'obtenir des fractions enrichies en composés d'intérêt. Une méthode de purification LL pour obtenir des fractions enrichies en composés phénoliques a été développée par Stiger-Pouvreau et al. (2014) et Ar Gall et al. (2015), et elle fait ses preuves pour l'identification de composés phénoliques actifs de macroalgues brunes (Le Lann et al., 2016 ; Surget et al., 2016) et d'halophytes (Surget et al., 2015). Dans notre étude, elle servira de référence pour les autres méthodes de purification testées. Cependant, tout comme la méthode d'extraction solide/liquide, cette technique n'est pas viable à l'échelle industrielle de part la grande quantité de solvant utilisée pour les lavages, et notamment des solvants non acceptés en cosmétique comme le dichlorométhane. Pourtant, la mise à l'échelle industrielle est un critère indispensable pour pouvoir valoriser les extraits ou fractions enrichies en composés phénoliques.

Des méthodes de purification alternatives des composés phénoliques existent, c'est le cas de la flash-chromatographie, la dialyse, l'ultrafiltration, l'extraction en phase solide, la chromatographie de partage centrifuge, la chromatographie sur couche mince ou encore la chromatographie liquide (Figure 2-1). Il est notamment possible de séparer nos molécules cibles en utilisant un processus de partage de composés entre une phase liquide (phase mobile) et une phase stationnaire (adsorbant solide) sous l'application d'une pression positive. C'est le cas de l'extraction en phase solide (SPE) ou la Flash-Chromatographie (FC). La méthode SPE a été développée dans les années 1980 en tant que méthode d'extraction (Santana et al.,

2009 ; Humbert, 2010). Cependant, elle a montré un intérêt certain en tant que méthode de semi-purification des composés phénoliques comme l'ont montré Zubia et al. (2009), Tanniou et al. (2014) ou Rajauria (2018). Concernant la FC, son objectif était de trouver une technique de séparation simple, rapide et peu coûteuse en comparaison notamment de la Chromatographie Liquide à Haute Pression (HPLC). Cette technologie a fait ses preuves dans la purification des composés phénoliques (Martínez et al., 2013; Tierney et al., 2013c, 2014 ; Heffernan et al., 2015a, b ; Kirke et al., 2017). Comme la SPE, la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) peut être utilisée en tant que méthode d'extraction (Tanniou et al., 2013) ou de purification (Lee et al., 2014b, 2015 ; Kim et al., 2016). C'est une extraction/purification liquide/liquide, comme la méthode de référence, à la différence que celle-ci est caractérisée par l'absence de support solide. Cette méthode permet la séparation et la purification de grandes quantités de composés dont la pureté peut être supérieure à 90% en une seule étape (Lee et al., 2014b). De plus, cette méthode réduirait le temps d'opération, permettrait d'obtenir de meilleurs rendements et des coûts plus faibles (Lee et al., 2014b). Ces 3 méthodes, SPE, FC et CPC, sont des méthodes dont la mise à l'échelle industrielle est possible.

Une fois l'obtention de fraction purifiée enrichie en composés phénoliques, la dernière étape est de caractériser ces composés (Figure 2-2). La caractérisation structurale des phlorotannins est effectuée le plus souvent par chromatographie liquide (LC) couplée à de la spectrométrie de masse (MS), ou par la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (Cérantola et al., 2006 ; Surget et al., 2015 ; Le Lann et al., 2016 ; Vissers et al., 2017). Cette caractérisation peut se réaliser également par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Dans cette étude, nous avons utilisé l'HPLC qui permet de séparer les composés phénoliques avant de les identifier. La plupart du temps, la séparation chromatographique est suivie d'une détection par absorption de radiations UV autour de 260 à 280 nm et d'une détection de masse. Les détecteurs de masse ont souvent une limite de détection d'environ 2000 Da et deviennent un facteur limitant puisque les phlorotannins sont connus pour avoir un poids moléculaire plus élevé (Nakai et al., 2006 ; Vissers et al., 2017). Pour l'analyse de molécules à poids moléculaire au-dessus de 500 Da, la spectrométrie de masse assistée par matrice (MALDI TOF-MS) a été considérée comme une technique appropriée (Vissers et al., 2017). Dans cette étude, nous avons donc expérimenté cette méthode.

Ce chapitre s'articule en deux parties. La première partie concerne le développement et l'optimisation de différentes méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques des algues brunes. Dans un premier temps, je me suis intéressée à la recherche des meilleurs paramètres pour l'extraction accélérée par solvant (ASE) et l'intérêt de la semi-purification par extraction en phase solide (SPE) chez *Ascophyllum nodosum* et *Halidryx siliquosa*. Ces résultats sont rassemblés dans un manuscrit à

soumettre. Ensuite, j'ai mis en place sur un extrait ASE d'*H. siliquosa* un protocole de purification par Flash-Chromatographie (FC) et réalisé des tests préliminaires de purification par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC). Ensuite, j'ai comparé ces différentes méthodes d'extraction et purification des composés phénoliques chez *Halidrys siliquosa* : l'extraction solide/liquide et la purification liquide/liquide, toutes deux à pression atmosphérique, ont été utilisées comme méthodes de référence. La méthode d'extraction alternative testée correspond à l'ASE, tandis que les trois méthodes de purification comparées sont la SPE, la FC et la CPC. La deuxième partie concerne la mise au point de méthode pour séparer et identifier la structure des composés d'intérêt par deux techniques différentes, la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) avec différents détecteurs ou la spectrométrie de masse (MALDI-TOF/TOF).

2 Comparaison de méthodes d'extraction et de purification pour obtenir des fractions enrichies en composés phénoliques

Différentes méthodes d'extraction et de purification sont menées sur les macroalgues brunes pour obtenir des fractions enrichies en phlorotannins. Il existe des méthodes classiques très utilisées mais de nouvelles méthodes alternatives sont recherchées par les industriels notamment pour leur impact environnemental moins important. Dans un premier temps, j'ai cherché les paramètres de l'ASE permettant d'obtenir des extraits riches en CP, semi-fractionnés ensuite par SPE. Cette recherche a été menée sur deux algues brunes pour observer si les paramètres d'extraction diffèrent selon les espèces. Cela fait l'objet d'une publication prête à être soumise à un journal. Ensuite, des méthodes de purification alternatives à la purification liquide/liquide classique ont été menées : un protocole de semi-purification par Flash chromatographie (FC) a été mise en place et des tests de purification préliminaires ont été réalisés avec la CPC. Enfin, j'ai comparé les différentes méthodes d'extraction et de purification classiques vs alternatives.

2.1 Matériel et méthodes

2.1.1 Matériel algal

Selon les expériences, l'étude a été menée sur deux algues brunes *Ascophyllum nodosum* et *Halidrys siliquosa* récoltées par l'entreprise C-Weed Aquaculture. La première a été récoltée en avril 2016 dans les Côtes d'Armor. La deuxième a été récoltée en janvier 2016 et janvier 2017 dans le Finistère. Après récolte, l'algue a été séchée selon le procédé mis en place par C-Weed Aquaculture, Science & Mer et le LEMAR, afin de préserver les propriétés des composés phénoliques, lors du séchage, puis les algues séchées ont été broyées (cf Chapitre 1, page 88).

2.1.2 Méthodes d'extraction

2.1.2.1 Extraction solide/liquide (MAC) : méthode de référence

L'extraction solide/liquide correspond à une macération c'est-à-dire à laisser macérer la biomasse algale en contact avec un solvant choisi. Ces extractions ont été menées sur l'algue brune *Halidrys siliquosa* récoltée en janvier 2016 et 2017, selon le protocole de [Stiger-Pouvreau et al. \(2014\)](#) : 15 g de poudre d'algues ont été extraits en duplicats avec pour chaque réplicat 150 mL du mélange éthanol:eau (50:50, v:v) à l'obscurité à 40°C sous agitation à 200 rpm (Julabo GmbH SW22, Allemagne) pendant 2 h. Les extraits ont ensuite été centrifugés à 1000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810, Allemagne) pendant 5 min et le surnageant récupéré. Le culot a été extrait une seconde fois avec 150 mL du même mélange de solvant pour chaque duplicat pendant 1 h. Au bout d'1h, l'étape de centrifugation a été répétée. Un volume total de 300 mL de surnageant a été obtenu pour chaque duplicat, et évaporé à l'aide d'un rotavapor (Laborota 4000 efficient, Heidolph, Allemagne) pour obtenir un extrait brut de 110 mL. Lorsqu'il y a une étape de

purification à la suite, une partie de l'extrait brut (en général 10 mL) est gardée pour être évaporée, reprise dans de l'eau, lyophilisée et analysée ; l'autre partie (en général 100 mL) est gardée pour être purifiée.

2.1.2.2 Extraction accélérée par solvant (ASE)

- Principe

L'ASE est une méthode d'extraction solide/liquide sous haute pression et haute température. Elle permet de chauffer des solvants à des températures au-delà de leur température d'ébullition mais de les conserver à l'état liquide. Dans un premier temps, l'échantillon (souvent réduit en poudre) est introduit dans la cellule d'extraction, souvent additionné avec du sable de Fontainebleau utilisé comme agent de dispersion (Figure 2-3). La cellule est insérée dans le four où une pompe transfère le solvant d'extraction dans la cellule. Ensuite, la cellule est pressurisée et chauffée. Par la suite, le solvant d'extraction s'écoule à travers la cellule et est recueilli dans un collecteur (tube ou bouteille) à l'extrémité du trajet de flux. Enfin, une fois l'extraction terminée, la cellule d'extraction est purgée à l'azote afin d'éliminer tous les résidus possibles de l'échantillon. Il existe deux systèmes d'extraction possibles avec l'ASE : dynamique c'est-à-dire que le solvant est pompé en continu dans la cellule, ou statique c'est-à-dire que le solvant reste pendant un temps donné dans la cellule (avec plusieurs cycles possibles) puis il est ensuite expulsé.

- Protocole mis en place sur l'extracteur ASE 150 (LEMAR) : recherche des meilleurs paramètres

La recherche des meilleurs paramètres pour réaliser l'extraction des composés phénoliques sur ASE a été effectuée sur l'extracteur Dionex™ ASE™ 150 (Etats-Unis) du LEMAR. Ces extractions ont été menées sur *Halidrys siliquosa* et *Ascophyllum nodosum* récoltées en janvier et avril 2016 respectivement. L'expérience a été menée dans une cellule de 10 mL contenant 3 g de poudre d'algues et 7 g de sable de Fontainebleau. Le solvant d'extraction utilisé était un mélange éthanol:eau (75:25, v:v). Le mode statique a été choisi avec une période de contact solvant-poudre dans la cellule de 5 min (temps pour un cycle) à une pression de 100 bar (= 1500 psi). Des extractions avec un nombre de cycle varié ont été effectuées (1, 2, 3 ou 5 avec la cellule retournée ou non) et des températures différentes (50, 100 et 150°C). Le volume de rinçage appliqué était de 100% et le temps de purge sélectionné était de 120 s. Après extraction, le solvant a été évaporé en utilisant un rotavapor (Laborota 4000 efficient, Heidolph, Allemagne), l'extrait a ensuite été repris dans de l'eau, congelé et lyophilisé (Beta 1-8 LD, Christ, Allemagne).

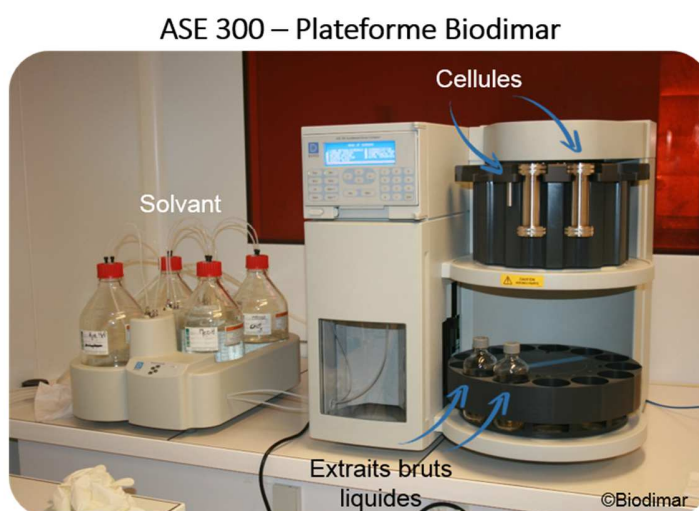
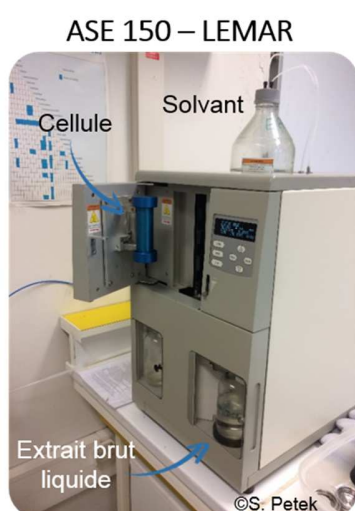
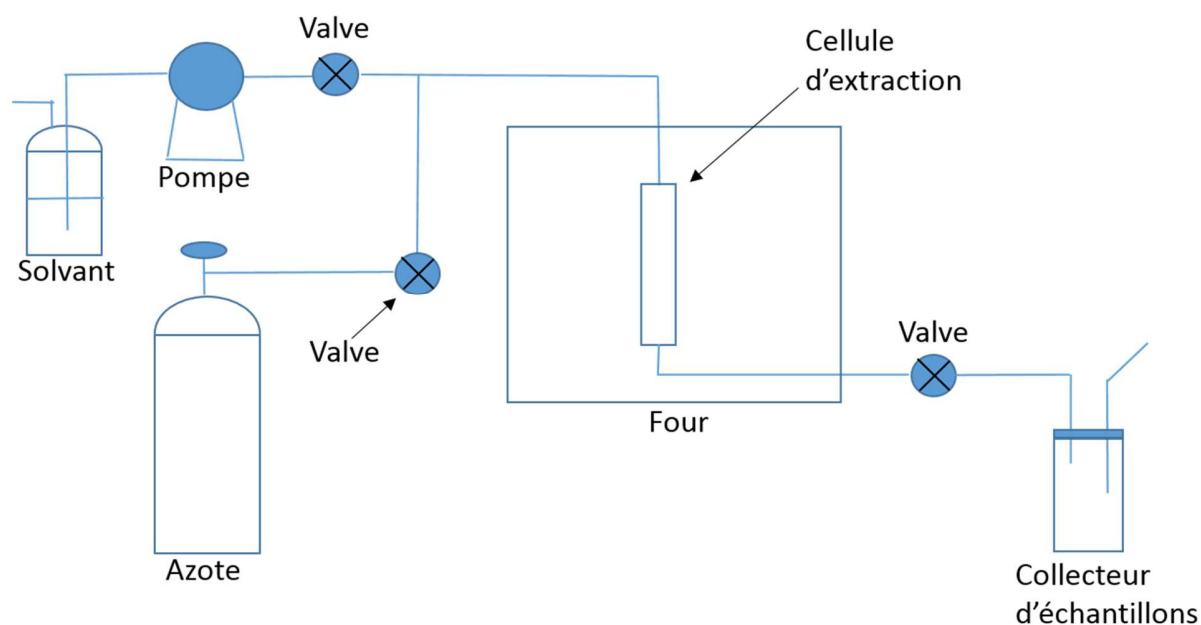


Figure 2-3 : Schéma modifié de Richter et al. (1996) du système d'extraction accélérée par solvant (ASE) ainsi que les photographies des deux appareils utilisés, l'ASE 150 au LEMAR et l'ASE 300 à la Plateforme Biodimar (Dionex™ ASE™).

- Protocole mis en place sur l'extracteur ASE 300 (Plateforme Biodimar)

L'extraction a été réalisée sur l'extracteur de la plateforme BIODIMAR possédant un carrousel (Dionex™ ASE™ 300, Etats-Unis). Cette extraction a été réalisée sur l'algue *Halidrys siliquosa* récoltée en janvier 2017. Dix grammes de poudre d'algues ont été mélangés avec environ 40 g de sable de Fontainebleau. Ce mélange a été déposé dans une cellule d'extraction d'un volume de 66 mL avec un filtre en cellulose à la sortie. Le mélange de solvant d'extraction utilisé était de l'éthanol:eau (75:25, v:v).

L'extraction a été réalisée à 150°C et 100 bar pendant 5 min selon un mode statique (suite à la recherche des meilleurs paramètres avec l'ASE 150). Un extrait brut liquide a été obtenu et évaporé (Laborota 4000

efficient, Heidolph, Allemagne) pour être remis en solution dans de l'eau, congelé puis enfin lyophilisé (Beta 1-8 LD, Christ, Allemagne).

2.1.3 Méthodes de purification

2.1.3.1 Purification liquide/liquide (LL) : méthode de référence

La purification liquide/liquide est une méthode de purification basée sur la différence de solubilité d'un soluté dans 2 phases non miscibles. Les extraits bruts d'*Halidrys siliquosa* (récoltée en janvier 2016 et 2017) obtenu par extraction S/L ont été semi-purifiés par purification LL pour concentrer les composés phénoliques. La purification a été effectuée en 3 étapes distinctes selon la méthode développée par [Stiger-Pouvreau et al. \(2014\)](#) : (1) trois lavages au dichlorométhane pour enlever les lipides (2) une précipitation à l'acétone suivi d'une précipitation à l'éthanol pour enlever les protéines et les sucres, et ensuite (3) trois lavages à l'acétate d'éthyle permettant d'obtenir deux fractions, la fraction aqueuse et la fraction acétate d'éthyle riche en composés phénoliques. Cette dernière fraction a été évaporée à l'aide d'un rotavapor (Laborota 4000 efficient, Heidolph, Allemagne), reprise dans de l'eau, congelée et lyophilisée pour être utilisée lors des analyses suivantes (Beta 1-8 LD, Christ, Allemagne).

2.1.3.2 Extraction en phase solide (SPE)

- Principe

L'obtention des molécules d'intérêt est basée sur un processus de partage des composés entre une phase liquide (phase mobile) et une phase stationnaire (l'adsorbant, qui est solide) sous l'application d'une pression positive. Le type de solvant d'élution de la phase mobile va dépendre du type de phase stationnaire et de la polarité des molécules d'intérêt. Les phases stationnaires en phase inverse non polaires ont été les premières à être utilisées pour extraire les composés phénoliques par SPE, et notamment la silice C₁₈ ([Generalić Mekinić et al., 2019](#)). Celle-ci correspond à un gel de silice sur lequel sont greffés des groupes octadécyles (18 atomes de carbone) qui retiennent les composés apolaires. Le protocole se déroule en général en 4 étapes distinctes ([Figure 2-4](#)). La première étape est le conditionnement de la phase stationnaire (ou colonne). Elle est aussi appelée étape d'activation de la colonne car elle va ainsi préparer la colonne à recevoir l'échantillon. La colonne est humidifiée par un solvant organique pour activer les sites de rétention, où se dérouleront par la suite les interactions moléculaires ([Humbert, 2010](#)). Puis est ajouté un solvant correspondant à la polarité du solvant dans lequel est dissout l'échantillon. La deuxième étape est le dépôt de l'échantillon, soit solide, soit liquide.

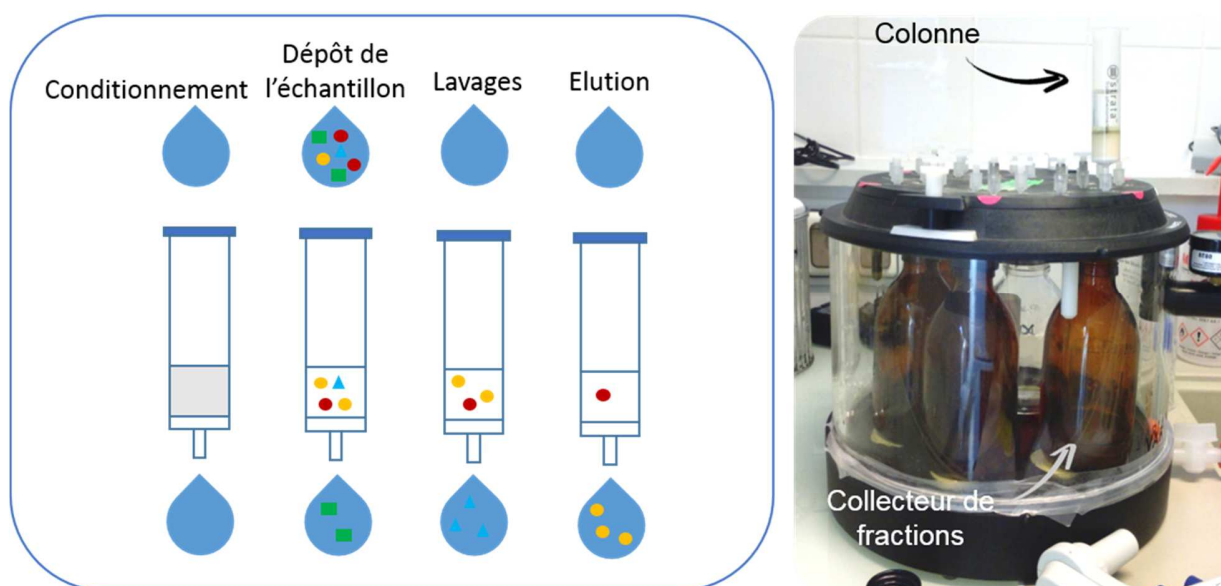


Figure 2-4 : Schéma des différentes étapes de la méthode d'extraction en phase solide (SPE), inspiré d'[Humbert \(2010\)](#), ainsi qu'une photographie du système SPE utilisé (Vac Elut SPS 24, Agilent Technologies, Etats-Unis).

La troisième étape correspond au lavage. Avant d'utiliser le solvant adéquat pour éluer les molécules d'intérêt, il est important de supprimer toutes les autres molécules. Cette étape permet d'améliorer nettement la purification de l'extrait grâce au passage d'un solvant ou d'un mélange de solvants ayant le plus d'affinité possible avec les impuretés et le moins possible avec les composés d'intérêt. Enfin, la quatrième étape est l'élution des molécules d'intérêt par le solvant approprié. Les avantages de cette méthode sont la réduction de la consommation de solvant et du temps de l'analyse ainsi qu'une automatisation possible. De plus, ce procédé peut-être « en ligne » (online) c'est-à-dire couplé à une chromatographie pour déterminer les composants ou « hors ligne » (offline) ([Santana et al., 2009](#)).

- Protocole mis en place

La SPE (Vac Elut SPS 24, Agilent Technologies, Etats-Unis) a été effectuée sur des extraits d'*Ascophyllum nodosum* et d'*Halidrys siliquosa* obtenus par ASE 150 (LEMAR). La colonne utilisée était une colonne de silice C₁₈ (Strata C18-E, 55 µm, 70 Å, 20 g / 60 mL, Giga Tubes, Phenomenex) capable de retenir les composés apolaires et laisser passer les composés polaires tels les composés phénoliques. Cela correspond donc à une séparation en mode inverse, c'est-à-dire que la phase stationnaire est apolaire. La colonne SPE a d'abord été activée et conditionnée par de l'éthanol et de l'eau respectivement, suivi par le dépôt de 0,5 g d'extrait mélangé à de la silice C₁₈. Différents solvants ont ensuite été apportés selon un gradient de polarité allant du plus polaire au plus apolaire : eau distillée, eau distillée:éthanol (50:50, v:v), éthanol, éthanol:dichlorométhane (50:50, v:v) et dichlorométhane ([Figure 2-5](#)). Les lavages ont permis d'éliminer les composés non souhaités tels que les composés très polaires (sucres, protéines) éliminés dès le premier

lavage à l'eau ou les composés apolaires non retenus par la colonne (pigments, lipides). Les fractions ont ensuite été évaporées (sauf la fraction eau) (Laborota 4000 efficient, Heidolph, Allemagne), reprises dans de l'eau, congelées et lyophilisées (Beta 1-8 LD, Christ, Allemagne).

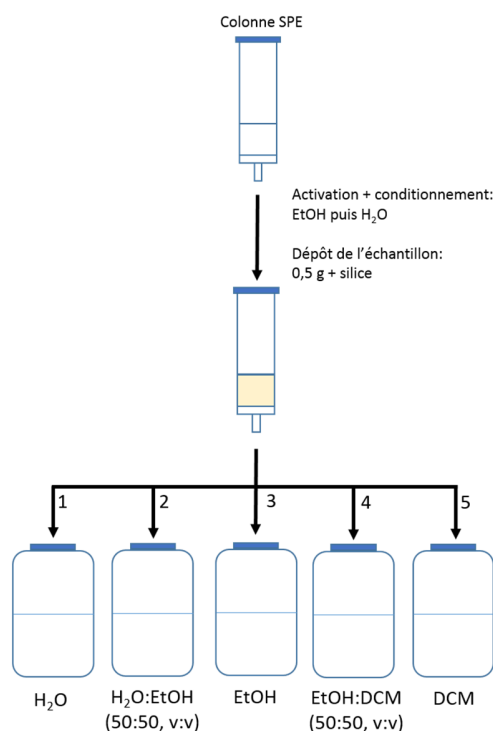


Figure 2-5 : Protocole de l'extraction en phase solide (SPE) appliquée à un extrait brut d'*Halidrys siliquosa* ou d'*Ascophyllum nodosum* obtenu par extraction accélérée par solvant (ASE 150). H₂O : eau distillée, EtOH : éthanol, DCM : dichlorométhane.

2.1.3.3 Flash-Chromatographie (FC)

- Principe

Cette méthode est, tout comme l'extraction en phase solide, basée sur la séparation de molécules à travers une phase stationnaire sous une pression positive, qui est en général plus importante pour la FC que pour la SPE. La FC suit les 4 mêmes étapes que la SPE (Figure 2-4). Au contraire de la SPE, c'est une technique semi-automatisée puisque le lancement de la FC peut se faire après avoir identifié les paramètres adéquats pour la séparation des molécules d'intérêt. Les solvants ou mélange de solvants sont déposés automatiquement à l'aide d'une pompe automatique (Figure 2-6). Le dépôt de l'échantillon est tout de même manuel, soit solide, soit liquide. Le processus séparatif de la FC est continu contrairement à la SPE dont le processus séparatif est discontinu. Des colonnes de plus grandes quantités peuvent également être utilisées, pour obtenir davantage de fractions purifiées finales. Grâce à la FC, il est également possible

Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale

de suivre l'absorbance de chaque fraction purifiée en direct et ainsi de décider de changer de collecteur d'échantillons si un pic apparaît à la longueur d'onde mesurée.

- Protocole mis en place

Le protocole a été adapté de [Zubia et al. \(2009\)](#) et l'appareil utilisé est la Chromatographie Flash/UV Spot Flash ARMEN (France) de la plateforme de Biodimar. La colonne a été choisie selon la polarité des molécules à sélectionner et pour réaliser une séparation en mode inverse (phase stationnaire apolaire) : nous avons utilisé une colonne en phase inverse en silice C₁₈ (Merck SVF D22, RP18, 15-40 µm, 11 g, volume de 20 mL). Dans un premier temps, la colonne a été activée par 5 volumes de colonne de méthanol puis conditionnée par le premier solvant utilisé c'est-à-dire 5 volumes de colonne d'eau milliQ (Figure 2-6). Une quantité de 250 mg d'extrait brut d'*Halidrys siliquosa* obtenu par l'ASE 300 a été solubilisée dans 1 mL d'éthanol et 200 µL d'eau milliQ puis mélangée à 2,5 g de silice. L'extrait incorporé à la silice a ensuite été déposé en dépôt solide sur la colonne. Ensuite, la séparation a été réalisée par différentes étapes d'élution à un débit de 15 mL.min⁻¹ avec différents solvants et 4 volumes de colonnes par étape. Les solvants utilisés étaient de l'eau milliQ (H₂O), eau milliQ:éthanol à 80:20 (v:v ; EtOH20), 60:40 (v:v ; EtOH40) puis 40:60 (v:v ; EtOH60), éthanol (EtOH100), éthanol:dichlorométhane à 50:50 (v:v ; ETOH:DCM) et enfin du dichlorométhane (DCM100). Chaque fraction a été récupérée dans une bouteille, évaporée, reprise dans de l'eau, congelée puis lyophilisée.

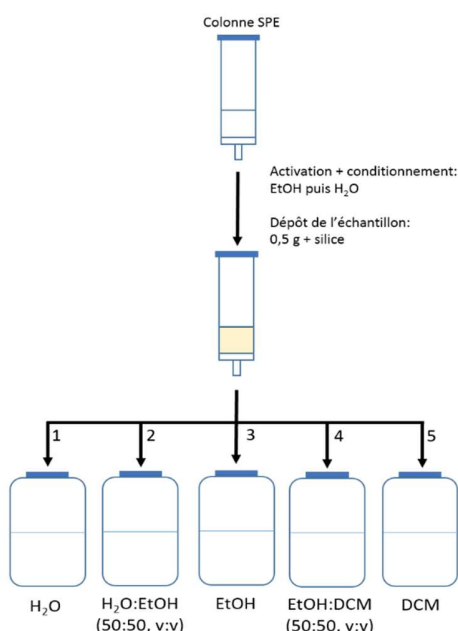


Figure 2-6 : A gauche : Protocole de la flash-chromatographie appliquée à un extrait brut d'*Halidrys siliquosa* obtenu par extraction accélérée par solvant (ASE 300 de la plateforme Biodimar). H₂O = Eau milliQ, MetOH = méthanol, EtOH = éthanol (utilisé à différentes dilution dans de l'eau distillée), DCM = dichlorométhane (utilisé pur et dilué de moitié dans de l'éthanol). A droite : Chromatographie Flash/UV Spot Flash d'Armen Instrument (France) de la plateforme Biodimar.

2.1.3.4 Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

- Principe

La chromatographie de partage centrifuge (CPC) est une méthode semi-automatisée pouvant être utilisée comme méthode d'extraction ou de purification. Elle est caractérisée par l'absence de support solide et par l'utilisation de systèmes biphasiques liquides pour la purification de tous types de molécules. C'est une chromatographie de partage liquide/liquide avec deux phases liquides non miscibles : la phase stationnaire est maintenue par la force centrifuge et la phase mobile est pompée à travers cette phase stationnaire. Cette dernière peut être mise en mouvement puisque l'appareillage est composé d'une colonne basée sur un axe de rotation, comme un rotor. Cette colonne est composée de disques dans lesquels se trouve un réseau formé de canaux et de cellules reliés entre eux (Figure 2-7A). La jonction de plusieurs disques entre eux forme la colonne de CPC. Deux modes d'élution sont réalisables : le mode ascendant avec la phase mobile légère et la phase stationnaire lourde ou le mode descendant avec la phase mobile lourde et la phase stationnaire légère (Figure 2-7B). Différents modes de fonctionnements peuvent être aussi utilisés, le mode d'élution-extrusion ou le mode dual. Le premier mode consiste à apporter une nouvelle phase stationnaire après une période d'élution classique pour pousser cette phase mobile puis la phase stationnaire hors de la colonne. Ainsi, en éliminant les deux phases, la totalité des molécules est collectée. Le deuxième mode (dual) consiste à inverser le sens de rotation de la colonne après une période d'élution classique. La phase stationnaire devient alors la phase mobile, et la phase mobile devient la phase stationnaire, ce qui permet d'éluer en sens inverse les composés d'intérêt. Dans ce deuxième mode, la séparation des molécules est continue jusqu'à leur sortie de la colonne. Dans notre cas, seul le mode dual a été utilisé.

Le système de solvants biphasiques peut être un mélange de deux solvants au minimum mais peut aussi être deux mélanges de plusieurs solvants. La séparation des solutés se réalise en fonction de leur coefficient de partage (K_d) selon la loi de Nernst dans le système biphasique sélectionné, coefficient calculé selon l'équation :

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

avec $[A]$ la concentration en la molécule d'intérêt A, « stat » correspondant à la phase stationnaire et « mob » à la phase mobile. Lorsque K_d est inférieur à 1, la molécule d'intérêt est complètement dissoute dans la phase mobile et n'est pas retenue dans le système (Figure 2-7A). Lorsque K_d est supérieur à 1, la molécule d'intérêt est trop retenue par la phase stationnaire. Enfin, lorsque K_d est égal à 1, cela signifie que la molécule d'intérêt est bien répartie et que la séparation est meilleure. Le meilleur coefficient de

partage pour la meilleure séparation des molécules se situe entre 0,5 et 3. Ce K_d peut-être déterminé par chromatographie sur couche mince ou par HPLC en regardant la solubilité de la molécule d'intérêt dans les deux phases non miscibles et ainsi déterminer le meilleur système de solvants.

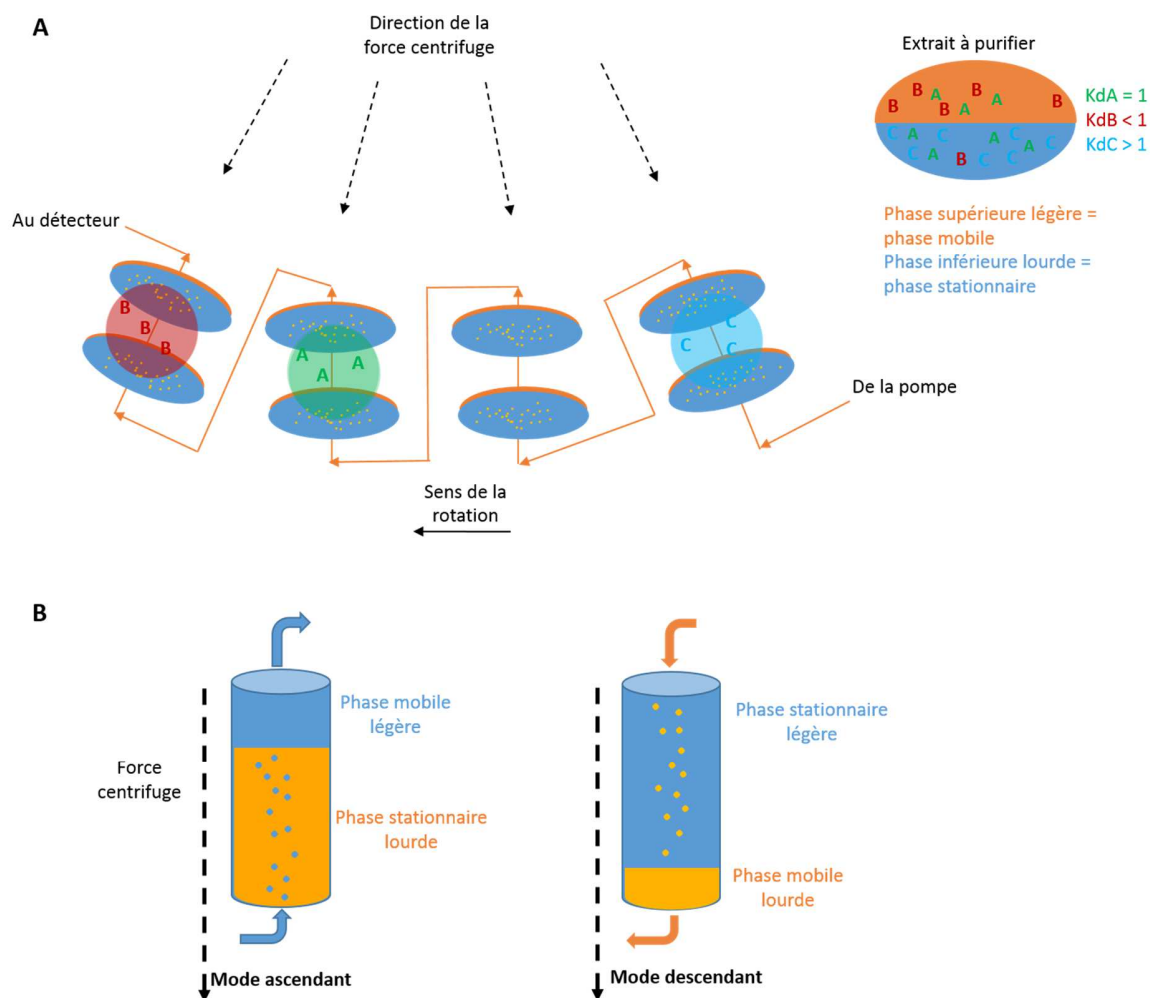


Figure 2-7 : A : Schéma des cellules présentes dans la colonne de l'appareil de Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC), en mode ascendant, dans le cas de figure des molécules A, B et C, dépendant de la valeur du coefficient de partage K_d . B : Schéma des différents modes d'élution possibles en Chromatographie de Partage Centrifuge : mode ascendant ou mode descendant.

- Détermination du système de solvants

Le système de solvants à utiliser pour extraire les composés d'intérêt est un système biphasique composé d'un mélange de solvants non miscibles. Le choix des solvants et ratio entre ceux-ci a été déterminé via la méthode de « shake flask » qui suit la gamme Arizona. Cette gamme Arizona est un système biphasique avec en mélange les solvants heptane, acétate d'éthyle, méthanol et eau, en proportions variables. Cette étude préalable du système de solvants, méthode de « shake flask », a permis de choisir celui qui

permettrait de réaliser une séparation optimale des composés d'intérêt, ici les composés phénoliques. Les différents systèmes de solvants ont été choisis en fonction de la répartition de l'extrait brut dans le mélange de solvants préparé. La répartition dépend de l'affinité et du comportement des molécules dans l'extrait en fonction des solvants présents (Boulho, 2017). Pour cela, 5 mg d'extrait brut (extrait ASE) ont été solubilisés dans 1 mL du mélange de solvants choisi (Tableau 2-1). Pour chaque système de solvants testé, les phases supérieure et inférieure ont été analysées par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) pour observer la séparation de nos molécules d'intérêt entre les deux phases (plaque CCM Gel de silice F254, Merck, KGaA, Allemagne). Le mélange de solvants pour l'élution de la plaque CCM était du chloroforme:méthanol (90:10, v:v). Deux plaques CCM ont été réalisées : une pour être exposée aux UV (365 nm) suite à son élution dans le mélange de solvant cité précédemment pour observer les composés phénoliques et l'autre pour être révélée avec une solution de DPPH pour observer l'activité anti-radicalaire que l'on suppose principalement due aux composés phénoliques (2,5 mg de DPPH dans 100 mL d'éthanol absolu) (Boulho, 2017).

Tableau 2 Erreur ! Utilisez l'onglet Accueil pour appliquer 0 au texte que vous souhaitez faire apparaître ici.-1 : Systèmes de solvants testés pour la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC).

	Mélange de solvants	Ratio (v:v)
1	Acétate d'éthyle:Eau milliQ	1:1
2	Hexane:Acétate d'éthyle:Méthanol:Eau milliQ	1:9:2:8
3	Hexane:Acétate d'éthyle:Ethanol:Eau milliQ	1:8:2:7
4	Heptane:Acétate d'éthyle:Méthanol:Eau milliQ	19:1:19:1

- Protocole

Le protocole a été adapté de Tanniou et al. (2013) et de Boulho (2017) en utilisant le système de solvants choisi après l'étude préalable (cf. paragraphe précédent). Le mode ascendant a été choisi puisque la phase mobile est la plus légère (acétate d'éthyle) et la phase stationnaire, aqueuse, est la plus lourde. Dans un premier temps, la colonne du système CPC (SCPC-50, Armen Instrument, France) a été remplie avec de l'eau milliQ, la phase stationnaire, à un débit de 30 mL.min⁻¹ et mise en rotation sur son axe à 500 rpm. C'est l'étape de préparation de la colonne (Tableau 2-2). Ensuite vient l'étape d'équilibration : l'acétate d'éthyle, la phase mobile, a été introduit dans le système à un débit de 8 mL.min⁻¹ et 1600 rpm. Lorsque le système est à l'équilibre, l'extrait d'*Halidrys siliquosa* obtenu par l'ASE 300 (75 mg.mL⁻¹ dilué dans l'eau) a été introduit dans le système via une seringue en verre. Deux essais de CPC ont été testés (CPC1 et CPC2). Pour la CPC1, la détection UV a été réalisée aux longueurs d'ondes 190 et 254 nm et la collecte des fractions tous les 9 mL. Pour la CPC2, la détection UV a été réalisée aux longueurs d'onde 240, 270 et 280 nm et la collecte des fractions tous les 25 mL.

Tableau 2-2 : Etapes de la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) appliquée à un extrait brut d'*Halidrys siliquosa* obtenu par extraction accélérée par solvant (ASE 300).

Etapes	Solvant	Débit	Vitesse de rotation
Préparation de la colonne	Eau milliQ	30 mL.min ⁻¹	500 rpm
Equilibration	Acétate d'éthyle	8 mL.min ⁻¹	1600 rpm
Injection de l'extrait	Eau milliQ		
Elution	Acétate d'éthyle	8 mL.min ⁻¹	1600 rpm
Extrusion	Eau milliQ	30 mL.min ⁻¹	1600 rpm

2.1.4 Comparaison des méthodes d'extraction et de purification

La Figure 2-8 résume les différentes méthodes d'extraction et de purification qui ont été réalisées.

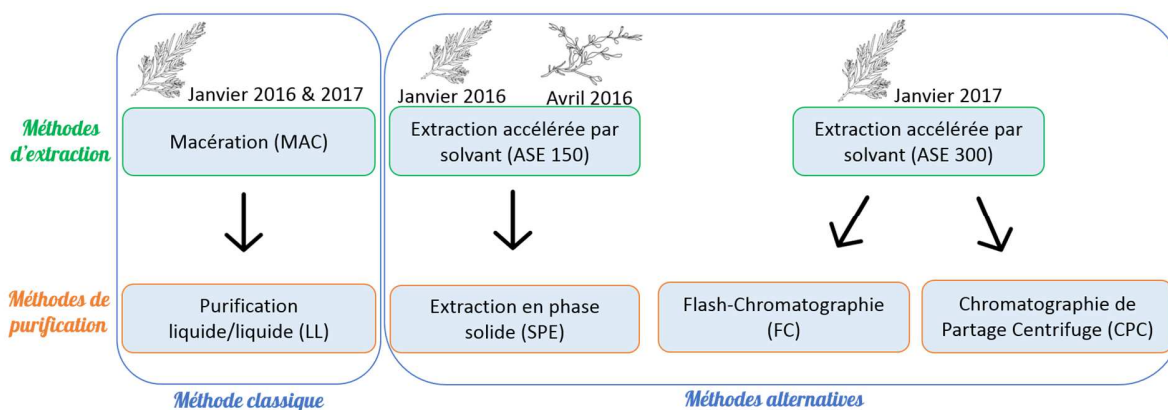


Figure 2-8 : Schéma récapitulatif des méthodes d'extraction et de purification mises en place dans cette étude sur *Ascophyllum nodosum* et *Halidrys siliquosa*. ASE 150 : réalisée sur l'appareil du LEMAR ; ASE 300 : réalisée sur l'appareil de la Plate-forme BIODIMAR.

Dans cette dernière partie, j'ai comparé ces différentes méthodes qui ont toutes été réalisées sur *Halidrys siliquosa*. Ces différentes méthodes ont utilisé des volumes de solvant différents ou encore des temps d'extraction différents. Pour comparer ces différentes méthodes, j'ai calculé la productivité de chacune d'elles. Pour cela, j'ai utilisé la formule de Tanniou et al. (2013) qui fait correspondre la productivité à la teneur en composés phénoliques par le temps d'extraction et le volume de solvant utilisé :

$$\text{Productivité} = \frac{TCP}{ExT \times SolQ}$$

Où TCP est la teneur en composés phénoliques en mg de CP par gramme d'extrait sec, ExT est le temps d'extraction en minutes et SolQ est la quantité de solvant en litres. La productivité est exprimée en mg de composés phénoliques par gramme d'extrait sec par minute et par litre de solvant (mg.g⁻¹ extrait sec.min⁻¹.L⁻¹).

2.1.5 Analyses des composés phénoliques (CP)

- Quantification des CP

La teneur en CP a été déterminée spectroscopiquement par le test du Folin-Ciocalteu (Zubia et al., 2009 ; Surget et al., 2015). Les puits de microplaques ont été remplis par 20 μL d'extrait/fraction, 130 μL d'eau distillée, 10 μL du réactif et 40 μL de Na_2CO_3 ($200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Le mélange a été incubé pendant 10 min à 70°C . Ensuite, la microplaque a été placée dans de la glace pour stopper la réaction chimique et l'absorbance a été lue à 620 nm (Mutiskan™ FC, Thermo Scientific™, Etats-Unis). La teneur en CP est exprimé en mg par g d'extrait sec ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ d'extrait) à partir d'une gamme étalon de phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene). Les analyses ont été effectuées en triplicat pour chaque extrait/fraction.

- Analyse par RMN

Les signatures moléculaires des extraits/fractions ont été obtenues par la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton (^1H) en utilisant un spectromètre de type Bruker Avance 400 de la plateforme RMN de l'UBO. Pour chaque analyse, 5 mg d'extrait ont été dissout dans 700 μL de solvant deutéré (soit méthanol soit eau). Les spectres ont été analysés avec le logiciel MestReNova (v 6.0.2-5475). Les spectres RMN permettent de donner des informations sur la composition des extraits/fractions et notamment le signal des composés phénoliques apparaissant entre 6,5 et 5,5 ppm.

2.1.6 Analyse des activités antioxydantes

- Test anti-radicalaire du DPPH

Le test anti-radicalaire du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) modifié selon Zubia et al. (2009) a été mis en place pour déterminer l'activité anti-radicalaire des extraits/fractions. Pour cette méthode, 22 μL d'extrait/fraction/contrôle ont été ajoutés à 200 μL de solution de DPPH ($25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) préparée dans les 24 h. Après 60 min à l'obscurité à température ambiante, l'absorbance a été lue à 540 nm. L'eau distillée a été utilisée comme contrôle négatif et l'acide ascorbique (vitamine C), l' α -tocophérol (vitamine E) et le 2,3-t-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) comme contrôles positifs. L'activité anti-radicalaire des extraits/fractions a été exprimée en IC_{50} ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), concentration de l'échantillon qui entraîne une diminution de 50% de l'activité du DPPH. Plus l' IC_{50} est faible, plus l'activité antioxydante est forte. Les analyses ont été effectuées en triplicat pour chaque extrait/fraction.

- Test du pouvoir réducteur du fer (FRAP)

L'activité réductrice a été évaluée par une réaction d'oxydoréduction entre les composés phénoliques de l'extrait/fraction et les ions métalliques de transition comme les ions ferriques. La méthode utilisée est celle de Zubia et al. (2009). Dans une microplaque, 25 μL de tampon de phosphate de sodium (0,2 mM, pH

6,6) et 25 μL de potassium ferricyanide à 1% ont été ajoutés à 25 μL d'extrait/fraction/contrôle. Après homogénéisation, les microplaques ont été incubées à 50°C pendant 20 min. La réaction a ensuite été stoppée dans la glace. Une première mesure de l'absorbance a été effectuée à 620 nm après l'addition de 25 μL d'acide trichloroacétique et 100 μL d'eau distillée. Finalement, 20 μL de chlorure de fer ont été ajoutés. Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 620 nm. Les vitamines C, E et le BHA ont été utilisés comme contrôle positif. Le pouvoir réducteur a été exprimé en EC50 (mg.mL^{-1}) après le calcul du pourcentage d'inhibition par comparaison avec le blanc (eau distillée). Plus l'EC50 est faible, plus le pouvoir antioxydant est fort. Les analyses ont été effectuées en triplicat pour chaque extrait/fraction.

- Test pour l'activité photoprotectrice (par Laurence Coiffard et Céline Couteau de l'Université de Nantes)

La méthode utilisée est décrite par [Couteau et al. \(2007 ; 2018\)](#). Brièvement, l'extrait est incorporé dans une émulsion huile-dans-eau et 50 mg ont été étalés avec le bout du doigt sur une plaque en polyméthylméthacrylate (PMMA). Puis, des mesures de transmission ont été effectuées sur 9 réplicats à l'aide d'un spectrophotomètre entre 290 et 400 nm (UV transmittance Analyze UV1000S, Labsphere, USA).

$$\text{SPF} = \frac{\sum_{290}^{400} E_{\lambda} I_{\lambda} \Delta_{\lambda}}{\sum_{290}^{400} E_{\lambda} I_{\lambda} \Delta_{\lambda}}$$

Avec E_{λ} l'irradiance spectrale de la lumière terrestre à λ , I_{λ} est le spectre d'action érythémal à λ et Δ_{λ} est la transmittance spectrale de l'échantillon à λ . L'activité photoprotectrice SPF (facteur de protection solaire) a été calculée entre 290 et 400 nm. En parallèle, l'activité photoprotectrice FP-UVA (facteur de protection UVA) a été calculée entre 320 et 400 nm.

- Test anti-élastase

L'élastase est une enzyme qui dégrade l'élastine, responsable de l'élasticité de la peau. Une activité anti-élastase prévient donc une perte d'élasticité et agit comme un agent anti-âge. Le protocole s'inspire de [Sallenave et al. \(1998\)](#) et a été optimisé dans le Chapitre 4 (cf. pages 244-247). Un tampon Tris-HCl a d'abord été préparé à une concentration de 179 mM et à un pH de 8 puis le substrat, N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe *p*-nitroanilide à 1,65 mM dans le tampon. La dernière solution était l'enzyme diluée avec le tampon à une concentration de 0,34 U.mL⁻¹. Dans une microplaque, 13 μL d'extrait ou de témoin ont été ajoutés à 93 μL de tampon et 52 μL de substrat. La microplaque a été incubée pendant 5 min à 25°C. Ensuite, 42 μL d'enzymes ont été ajoutés. Une cinétique a été réalisée à 410 nm, toujours à 25°C pendant 4 min. L'épigallocatechine gallate (EGCG) a été utilisé comme témoin positif. Pour obtenir le pourcentage d'inhibition de l'enzyme, la tangente à la pente, qui correspond à la vitesse initiale de l'enzyme, a été calculée et utilisée dans l'équation suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{S_i - S_{iF}}{S_i} * 100$$

Avec S_i , la vitesse initiale de l'enzyme sans l'extrait ou le témoin, et S_{iF} , la vitesse initiale de l'enzyme avec l'extrait ou le témoin.

- Test anti-tyrosinase

La dépigmentation considérée comme une activité anti-âge a été évaluée grâce à l'évaluation de l'inhibition de la tyrosinase par les extraits d'algues. Le protocole s'inspire de [Chan et al. \(2008\)](#) et [Lim et al. 2009](#)) et a été optimisé dans le Chapitre 4 (cf. pages 247-249). Un tampon phosphate a été préparé à pH 6,5 et 0,1 M en mélangeant 4,117 g de Na_2HPO_4 et 8,639 g de NAH_2PO_4 . La deuxième solution, correspondant au substrat, consiste en une solution de L-tyrosine à 1,694 mM solubilisée dans de l'eau distillée. Un volume de 2,5 mL de cette solution a ensuite été ajouté à 2,5 mL de tampon phosphate et 2,25 mL d'eau distillée pour obtenir le réactif L-tyrosine. Ensuite, la solution enzymatique était à une concentration de 317,71 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de tyrosinase. Dans la microplaque, 20 μL d'extrait ou de témoin ont été ajoutés à 243 μL de réactif L-tyrosine et le mélange a été incubé à 25°C pendant 5 min. Enfin, 42 μL , d'enzymes ont été ajoutés et une cinétique a été réalisée à 475 nm, toujours à 25°C pendant 5 min. Le calcul du pourcentage d'inhibition est le même que pour le test anti-élastase. L'acide kojique a été utilisé comme témoin positif.

2.1.7 Tests statistiques

Le logiciel R pour Windows a été utilisé, avec l'environnement de développement intégré RStudio (v 1.2.1335). Les résultats sont donnés sous la forme de moyenne \pm écart-type. L'homogénéité des variances a été testée avec le test de Bartlett avec un risque d'erreur de 5%. Quand l'homogénéité des variances était respectée, l'ANOVA à un facteur a été utilisée. Quand l'homogénéité des variances n'était pas respectée, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été appliqué avec un niveau de significativité de 95%. Quand des différences significatives apparaissaient, des comparaisons étaient possibles grâce au test post-hoc Tukey après l'ANOVA et au test Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR) après le test Kruskal-Wallis.

2.2 Résultats

2.2.1 Intérêt de combiner l'extraction accélérée par solvant et l'extraction en phase solide pour générer des polyphénols actifs marins à partir de deux algues brunes

Les résultats de l'étude sur l'extraction accélérée par solvant suivie de l'extraction en phase solide pour générer des polyphénols actifs marins de deux algues brunes sont rassemblés dans un manuscrit rédigé en anglais à soumettre pour publication prochainement.

Résumé

Les méthodes d'extraction conventionnelles telles que la macération sont utilisées depuis des années mais elles engendrent un impact néfaste sur l'environnement notamment par la forte consommation de solvant et d'énergie. Des méthodes alternatives se sont développées dont l'extraction accélérée par solvant (ASE) suivie de l'extraction en phase solide (SPE) permettant d'extraire les métabolites d'intérêt de divers organismes. Dans notre étude, deux macroalgues brunes, *Ascophyllum nodosum* et *Halidrys siliquosa*, produisant différents types de phlorotannins ont été choisies pour optimiser le processus d'extraction des polyphénols par ASE. Les extractions ont été effectuées en modifiant des paramètres tels que la température (75, 100 et 150°C) et le nombre de cycles (1, 2, 3 ou 5) avec un retournement ou non de la cellule. La résonance magnétique nucléaire (RMN) et le test colorimétrique de Folin-Ciocalteu ont permis la détection et la quantification des composés. Les activités antioxydantes (DPPH et FRAP), anti-âge (anti-tyrosinase et anti-élastase) et photoprotectrices ont été déterminées par des tests *in vitro*. Les extraits ASE des deux espèces présentant la teneur en composés phénoliques et les activités associées les plus élevées ont ensuite été sélectionnés pour réaliser une semi-purification par extraction en phase solide (SPE). La température optimale pour obtenir un niveau de composés phénoliques actifs élevée par ASE était de 150°C pour les deux algues. Aucune différence significative n'a été constatée pour le nombre de cycles, c'est pourquoi nous suggérons l'utilisation d'un seul cycle pour gagner en temps d'extraction et en énergie. Un procédé de SPE a été réalisé sur deux extraits obtenus par ASE : 1C150 pour *A. nodosum* et 2C150 pour *H. siliquosa*. La majorité des composés phénoliques s'est retrouvée dans la fraction éthanolique pour la première et dans la fraction hydroéthanolique pour la deuxième. L'ASE a permis d'obtenir des extraits riches en composés phénoliques avec un impact moindre sur l'environnement et des conséquences économiques notamment en utilisant moins de solvant. La méthode SPE permet davantage de concentrer les composés phénoliques actifs en multipliant 1,8 et 2 la teneur en composés phénoliques chez *A. nodosum* et *H. siliquosa*. Grâce à ces fractions enrichies, l'étape suivante est d'identifier la structure des phlorotannins actifs des deux algues.

Interest to combine Accelerated Solvent Extraction and Solid-Phase Extraction to generate marine active polyphenols from two brown seaweeds

Leslie Gager¹, Solène Connan¹, Céline Hubert¹, Céline Couteau², Laurence Coiffard², Stéphane Cérantola³, Valérie Stiger-Pouvreau¹

¹ Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, F-29280 Plouzane, France

² Faculty of Pharmacy, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, LPiC, MMS, EA2160, 9 rue Bias, BP53508, 44000 Nantes, France

³ Plateforme RMN-RPE, Université de Bretagne Occidentale (UBO), 6 avenue Victor Le Gorgeu, CS 93837, 29238 Brest Cedex 3, France

Abstract

Conventional extraction methods such as maceration have been used for years despite their high environmental impact. Then, alternative methods to extract natural molecules have been developed such as Accelerated Solvent Extraction (ASE) followed by Solid-Phase Extraction (SPE) allowing an optimal extraction of compounds. In our study two brown macroalgae, *Ascophyllum nodosum* and *Halidrys siliquosa*, producing different sizes of polyphenols were chosen to optimize the hydroethanolic ASE extraction process of polyphenols. Extractions were carried out by changing parameters such as temperature (75, 100 and 150°C) and the number of cycles (1, 2, 3 or 5) with the cell turned over or not. Proton Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR) and the colorimetric test of Folin-Ciocalteu allowed the detection and quantification of phlorotannins. Antioxidative (DPPH and FRAP), anti-ageing (tyrosinase, elastase), and the Sun Protection Factor (SPF) were determined by *in vitro* tests. ASE extracts showing the highest TPC and activities were then selected to realize a semi-purification

using a Solid-Phase Extraction (SPE). The optimum temperature to obtain a high phenolic content using ASE and antioxidant activities closed to positive controls was 150°C for both algae. No significant difference was found for the number of cycles, therefore we suggest the use of only one cycle as it was shorter and less energetic. A semi-purification process was carried out on two extracts obtained by ASE: 1C150 for *A. nodosum* and 2C150 for *H. siliquosa*. The majority of phenolic compounds were found in ethanolic fraction for the first seaweed and hydroethanolic fraction for the second. ASE allowed extracts rich in phenolic compounds to be obtained with a lower impact on the environment and economical consequence in particular by using a smaller amount of hydroalcoholic solvent and less time consuming. The SPE method allowed to get more concentrated fractions of active phenolic compounds by multiplying the phenolic content by 1.8 and 2 in *A. nodosum* and *H. siliquosa*. With these enriched fractions, the next step would be to identify the molecular structure of phlorotannins for both algae.

Keywords

Antioxydant, green extraction, macroalgae, phlorotannins, photoprotection

Introduction

Seaweeds draw attention in various economic sectors for their particular properties: in France, 75% of the harvested seaweeds is used for the food-processing industry, chemistry, microbiology and approximately 25% in agricultural, health and well-being sector (Mesnildrey et al., 2012). Living along marine coastal areas, seaweeds are affected by numerous biotic and abiotic environmental parameters that have an impact on their physiology, such as grazing by herbivorous (fish, molluscs), UV radiation or epiphytism (Geiselman & McConnell, 1981; Jennings & Steinberg, 1997; Swanson & Druehl, 2002; Amsler, 2012). They protect themselves against these stresses through the synthesis of specific molecules such as phenolic compounds. In brown algae (Phaeophyceae), phenolic compounds are referred to phlorotannins which are phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) units with different polymerization degrees (Ragan & Glombitza, 1986). Depending on the algal species, phlorotannin content can reach up to 25-30% DW. These molecules provide interesting biological functions as antimicrobial, antioxidant or photoprotective activities (Shalaby, 2011; Stengel et al., 2011; Tanniou et al., 2013; Stengel & Connan, 2015; Couteau & Coiffard, 2016; Le Lann et al., 2016; Stiger-Pouvreau & Guérard, 2018; reviewed by Gager et al., 2019).

To be valorized, many steps such as extraction, isolation of phlorotannins by purification or semi-purification processes and identification are required. Unfortunately, they are often quite long and expensive which hinder their industrial development. Even if traditional technologies with solvent extraction indicate a simple approach to metabolite isolation, there are several limitations such as low yield and purity, high solvent consumption and long processing times (Esquivel-Hernández et al., 2016). For all those reasons, new green alternative methodologies and solvents are investigated to extract bioactive compounds. Chemat et al. (2012) defined "green extraction" as "all processes of extraction which reduce energy consumption, which allow alternative solvent and renewable products but also the insurance of a healthy and high quality extract". This team has also defined a list of six principles for green extraction of natural products which should be consulted by industrial and scientific organisms to develop an innovative and green label.

Many promising extraction processes can be found in the literature with supercritical fluid extraction (SFE), micro-wave, enzymes and ultrasound-assisted extraction and also accelerated solvent extraction (ASE) (Zubia et al., 2009; Tanniou et al., 2013; Hardouin et al., 2016; Michalak & Chojnacka, 2014; Poojary et al., 2016; del Pilar Sánchez-Camargo et al., 2016; Montero et al., 2016). This latter, also called pressurized fluid extraction (PFE), pressurized liquid extraction (PLE), pressurized

solvent extraction (PSE) or enhanced solvent extraction (ESE) (Turner et al., 2010) is a green technology introduced in 1990s which is based on the same principle as traditional liquid extraction (Richter et al., 1996). This technology is considered like a green extraction because it is faster than a conventional extraction and uses small amounts of organic solvent (Esquivel-Hernández et al., 2016). Several publications have already highlighted its efficiency on the extraction of phenolic compounds from seaweeds (Zubia et al., 2009; O'Sullivan et al., 2013; Tanniou et al., 2013; Tierney et al., 2013; Montero et al., 2016). A wide range of solvents can be used, giving the possibility to replace hazardous solvents with healthier ones for the environment such as water, ethanol or limonene. However, ASE is less selective than SFE because a wide range of compounds can be extracted simultaneously with this technique. Additional step of purification must then be added to get specific molecules. For instance, Solid-Phase Extraction (SPE) is a semi-purification method which allow compounds to be recovered through elution after their adsorption on a stationary phase contained in a cartridge (Santana et al., 2009). This method was already used for the extraction of phlorotannins from seaweeds (Zubia et al., 2009; Tanniou et al., 2014).

Brittany, at the north-western part of France, is an area where the biomass and diversity of macroalgae is remarkable (Dizerbo et al., 2007; Bourgougnon and Stiger-Pouvreau, 2011; Burel et al., 2019). Among the high diversity of macroalgae

in Brittany, we selected two different species which synthesized different classes of phenolic compounds, *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis and *Halidrys siliquosa* (Linnaeus) Lyngbye which belong respectively to Fucaaceae and Sargassaceae families. The first, as a Fucaaceae species, is known to produce larger phlorotannins compared to Sargassaceae species (Cérantola et al., 2006; Breton et al., 2011; Stiger-Pouvreau et al., 2014). Moreover, those two species are known to yield high phenolic content and/or active compounds (Connan et al., 2004; Zubia et al., 2009; Le Lann et al., 2016).

A focus on the ASE by varying different parameters has never been published on these two seaweeds. The aims of this study were then (1) to find the ASE parameters allowing the best total phenolic content and activities, (2) to use ¹H NMR analysis to monitor the presence of phenolic compounds in extracts/fractions, (3) to show and compare radical scavenging, antioxidant, photoprotective and anti-aging activities of seaweed extracts obtained with ASE and finally, (4) to purify partially the best ASE extract using SPE. We propose the ASE process followed by SPE as an alternative to classical extractive methods for industrial purposes as for example the cosmetic sector.

Materials and methods

Algal material

The two brown seaweeds (Ochrophyta, Phaeophyceae, Fucales), *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis (Fucaaceae) and *Halidrys siliquosa*

(Linnaeus) Lyngbye (Sargassaceae) were collected in the west part of Brittany by the SME C-WEED AQUACULTURE in April 2016 and January 2016 respectively. Seaweeds were dried and then ground to powder using a ball mill (Retsch MM400, Germany).

Accelerated Solvent Extraction (ASE)

Extractions were performed thanks to an Accelerated Solvent Extractor system (Dionex™ ASE™ 150, USA). In all cases 3 g of dried algae mixed with sand were loaded into a 10 mL stainless steel extraction cell, fitted with cellulose filters at the inlet and outlet. Extraction parameters were chosen according to earlier studies (Santoyo et al., 2009; Zubia et al., 2009; Borrás-Linares et al., 2011; Tanniou et al., 2013; Tierney et al., 2013; del Pilar Sánchez-Camargo et al., 2016; Montero et al., 2016). Mixtures composed of water and ethanol were used with a ratio 75:25 as described by Tanniou et al. (2013). Static time (the time the solvent remains in the cell) was 5 min (time of one cycle) and the pressure was set at 100 bar (=1500 psi). Extractions were performed with different numbers of cycles (1, 2, 3 or 5 with the cell turned over or not) at three different temperatures (75, 100 and 150°C). The applied rinse volume was 100% and the purge time was 120 s. After extraction, the solvent was evaporated using a rotary evaporator (Laborota 4000 efficient, Heidolph, Germany) and the extract was freeze-dried (Beta 1-8 LD, Christ, Germany).

Semi-purification by Solid-Phase Extraction (SPE)

ASE extracts showing the highest total phenolic content (TPC), the best antioxidant and photoprotective activities were selected to realize a semi-purification using a Solid-Phase Extraction (Vac Elut SPS 24, Agilent Technologies, USA). The compounds in the liquid phase were separated from the other elements by selective adsorption on a solid phase according to physicochemical properties. Ready-to-use SPE cartridge containing C₁₈ silica (Strata C18-E, 55µm, 70, 20 g / 60 mL, Giga Tubes, Phenomenex) were used. The SPE cartridge was firstly primed with ethanol and distilled water and followed by a deposit of 0.5 g of the crude extract mixed with silica. Solvents with different polarities were added on the cartridge to obtain five fractions: distilled water, distilled water:ethanol (50:50, v:v), ethanol, ethanol:dichloromethane (50:50, v:v) and dichloromethane. In order to maximize the contact between the extract and the different solvents, the solvents were passed through the cartridge four times. The solvents were then evaporated using a rotary evaporator (Laborota 4000 efficient, Heidolph, Germany) and fractions were freeze-dried (Beta 1-8 LD, Christ, Germany).

¹H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analysis of extracts

The molecular signatures of extracts and fractions were obtained using ¹H NMR analyses using a Bruker Avance 400. For each analysis, 5 mg of extract were dissolved in 700 µL of deuterated methanol (MeOD). The spectra were analyzed with

MestReNova software (v6.0.2-5475). ^1H NMR spectra gave information on the composition of extracts and especially the signal of phenolic compounds which appeared between 6.5 and 5.5 ppm.

Total Phenolic Content (TPC)

The TPC was colorimetrically determined by spectrophotometry using an adapted Folin-Ciocalteu assay (Zubia et al., 2009; Surget et al., 2015). The wells were filled with 20 μL of extract, 130 μL of distilled water and 10 μL of Folin-Ciocalteu reagent followed by 40 μL of Na_2CO_3 (200 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). The mixture remained 10 min at 70°C . The microplate was then put on ice to stop the chemical reaction and the absorbance was read at 620 nm (Multiskan™ FC, Thermo Scientific™, USA). The TPC was expressed in milligram per gram of algal dry weight (mg g^{-1} DW) or per gram of extract (or fraction) dry weight from a standard curve of phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene). This analysis was carried out in triplicate for each extract.

DPPH radical scavenging assay

The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay modified according to Zubia et al. (2009) was used to determine the radical scavenging activity of extracts and fractions. For this method, 22 μL of extracts/fractions were added to 200 μL of DPPH solution ($25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) prepared fresh daily. After 60 min in the dark at room temperature, absorbance was read at 540 nm. Distilled water was used as a negative

control and ascorbic acid (vitamin C), α -tocopherol (vitamin E), together with 2,3-t-butyl-4-hydroxyanisole (butylated hydroxyl-anisole, BHA) and 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (butylated hydroxytoluene, BHT) as positive controls. This analysis was carried out in triplicate for each extract/fraction. The radical scavenging activity of extracts/fractions was expressed as IC_{50} ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), the concentration of substrate that causes a 50% loss of the DPPH activity. A weak IC_{50} is indicative of a high antioxidant activity.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

Reducing activity was evaluated by reaction of oxydoreduction between phenolic compounds of the extract/fraction and transition metal ions like ferric irons. The method used was adapted from Zubia et al. (2009). On microplate, 25 μL of sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 25 μL of ferricyanide potassium at 1% were added to 25 μL of extracts/fractions (or controls). After homogenization, microplates were incubated at 50°C during 20 min. The reaction was stopped on ice. A first measurement of the absorbance at 620 nm was made after the addition of 25 μL of trichloroacetic acid and 100 μL of distilled water. Finally, 20 μL of iron chloride was added. After 10 min, absorbance was measured at 620 nm. BHA, BHT, vitamins C and E were used as positive controls. This analysis was carried out in triplicate for each extract/fraction. The ferric reducing antioxidant power was expressed as the EC_{50} value ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) after calculating a percentage of

inhibition through comparison to a blank (distilled water). A lower EC50 value means a high reducing power of the sample.

Elastase inhibition

Elastase degrades elastin, which is responsible for the skin's elasticity. An anti-elastase activity therefore prevents a loss of elasticity and acts as an anti-aging agent. The protocol was inspired from Sallenave et al. (1998). First, a Tris-HCl buffer was made at a concentration of 179 mM and a pH of 8. The substrate, N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide, was then prepared at 1.65 mM with the buffer. The last solution was the enzyme diluted with the buffer to obtain a concentration of 0.34 U.mL⁻¹. On microplate, 13 µL of extract or control were added with 93 µL of buffer and 52 µL of substrate. The microplate was incubated during 5 min at 25°C. Then, 42 µL of enzyme were finally added. A kinetic was performed at 410 nm, always at 25°C during 4 min. Epigallocatechin gallate (EGCG) was used as a positive control. To obtain the percentage of inhibition of the enzyme, the slope, which corresponds to the initial speed of the enzyme, was calculated and used in the following equation:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{S_i - S_{iF}}{S_i} * 100$$

with S_i , the initial speed of the enzyme without the extract or the control and S_{iF} , the initial speed of the enzyme with the extract or the control. Only ASE extracts showing the highest total phenolic content (TPC) were selected to determine their anti-elastase activity.

Tyrosinase inhibition

Depigmentation considered as an anti-aging activity was evaluated thanks to the assessment of the tyrosinase inhibition activity of extracts. The protocol was inspired from Chan et al. (2008) and Lim et al. (2009). A phosphate buffer was prepared at pH 6.5 and 0.1 M by mixing 4.117 g of Na₂HPO₄ and 8.639 g of NaH₂PO₄. The second solution, corresponding to the substrate, consists of a 1.694 mM L-tyrosine solution solubilized in distilled water. A volume of 2.5 mL of this solution was then added to 2.5 mL of phosphate buffer and 2.25 mL of distilled water to obtain the L-tyrosine reagent. Then, the enzymatic solution was at a concentration of 317.71 U.mL⁻¹ of tyrosinase. In the microplate, 20 µL of extract or control were added with 243 µL of L-tyrosine reagent and the mixture was incubated at 25°C during 5 min. Finally, 42 µL of enzymes were added and a kinetic was performed at 475 nm, always at 25°C during 5 min. A blank was made for each extract replacing substrate by buffer. Kojic acid was used as a positive control. The percentage of inhibition of the enzyme was calculated in the same way as for the elastase inhibition.

Photoprotective efficacy

The Sun Protection Factor (SPF and PF-UVA) was determined to get the photoprotective efficiency of extracts and UV-B and UV-A ranges. The method is described by Couteau et al. (2007, 2018).

Briefly, the extract was incorporated in a basic oil-in-water (O/W) emulsion and 50 mg were spread with the finger on a polymethylmethacrylate

(PMMA) plate. Then, transmission measurements were made on 9 replicates using a spectrophotometer (UV transmittance Analyzer UV1000S, Labsphere, USA).

Statistical analyses

The software R for Windows was used, with the RStudio (v.1.0.136) integrated development environment. All laboratory analyses were performed in triplicate, and results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Homogeneity of variances was tested with Bartlett test at the 0.05

followed by a Tukey post-hoc test. When homogeneity of variances was not respected, which means data did not respect requirement for ANOVA, Kruskal-Wallis tests were performed at a significance level of 95%. When significant differences appeared, non-parametric multiple comparisons were applied thanks to Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR). The Pearson correlation coefficient (r) was also calculated to observe relationship between the phenolic content and biological

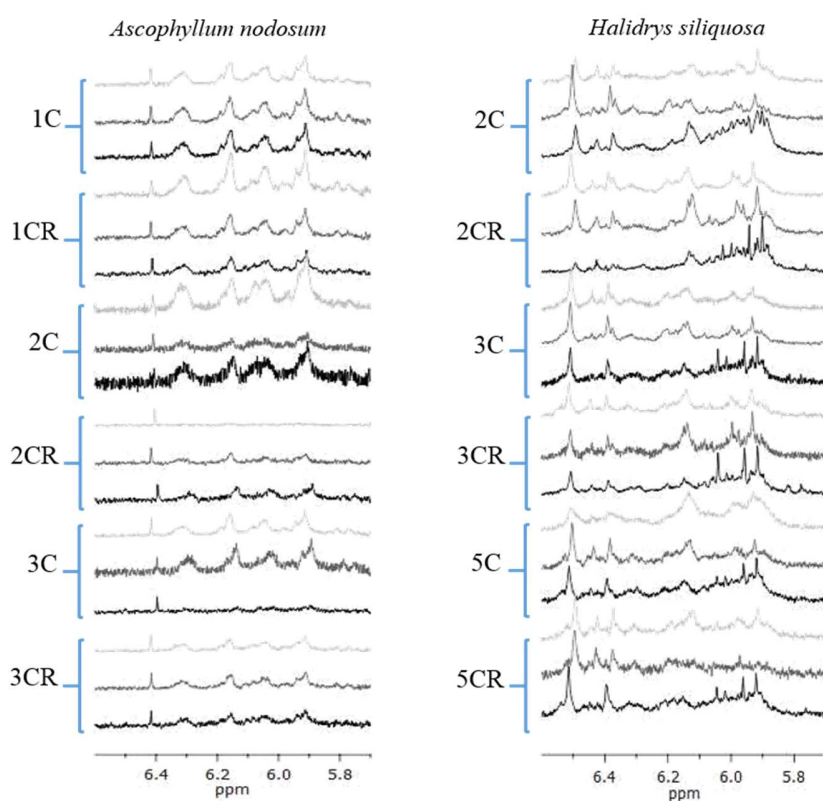


Figure 1: ^1H NMR analyses on ASE extracts from *Ascophyllum nodosum* on the left and *Halidrys siliquosa* on the right in the 5.75-6.6 ppm area corresponding to phenolic compounds. The number (1C, 2C...) means the number of cycle(s) and "R" means there is a turn over of the cell. The color of the spectra matches with the temperature: light grey for 75°C, dark grey for 100°C and black for 150°C.

risk error. When homogeneity of variances was respected, one-way ANOVA was performed

activities ($p < 0.05$).

Results

¹H NMR spectra of ASE extracts

Phenolic compounds were observed between 5.7 and 6.6 ppm, thanks to ¹H Nuclear Magnetic Resonance (Figure 1). In both algae, the presence of those molecules was observed in extracts whatever the number of cycles and the temperature of the ASE extraction. The phenolic profile between the two algae was different which mean that they did not have the same phenolic compounds. However, if we look precisely at the profiles for the different extraction conditions, the profile of *A. nodosum* was not modified but the intensity of the peaks was lower when the number of cycles increased. As with the latter, the *H. siliquosa* profile did not change but the peaks were less intense.

Total Phenolic Content (TPC) and extraction yield using ASE process

Extracts from *H. siliquosa* had a higher TPC than those from *A. nodosum*, with a maximum of 100.05 mg.g⁻¹ algal DW and 29.51 mg.g⁻¹ algal DW

respectively for the same extraction procedure 3CR150 (3 cycles at 150°C with the cell turned over). For both seaweeds, the temperature had an significant impact on the TPC (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). First, the highest TPC for each cycle was obtained at 150°C for *A. nodosum* (One-way ANOVA, $p < 0.05$), except for the extract 3C (3 cycles) with no significant difference between 100° and 150°C (One-way ANOVA, $p = 0.833$) (Figure 2). The highest TPC was also obtained at 150°C for *H. siliquosa* for the extracts 2C, 2CR, and 3C (One-way ANOVA and Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). Concerning the extract 3CR, no difference of TPC between 100° and 150°C was highlighted (Kruskal-Wallis, $p = 0.251$) and no difference of TPC was showed with the extract 5C whatever the temperature applied (Kruskal-Wallis, $p = 0.814$). For the extract 5CR, a significant difference in TPC was highlighted between 100° and 150°C with the highest level at 100°C (Kruskal-Wallis, $p = 0.041$). The number of cycles did not affect TPC as much as

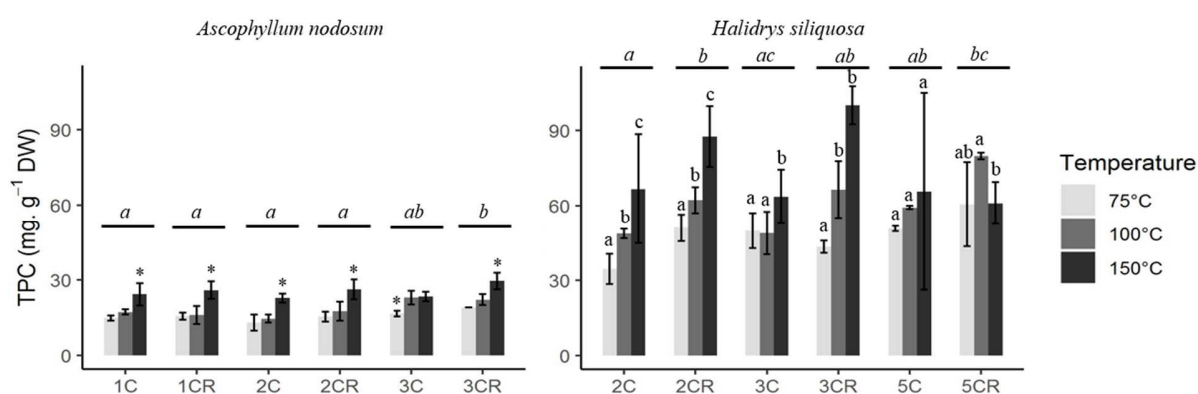


Figure 2: Total Phenolic Content (TPC) in extracts obtained by ASE with different cycles and temperatures (1C = 1 cycle, 1CR = 1 cycle with cell turn over) for *Ascophyllum nodosum* and *Halidrys siliquosa*. Letters and stars indicate differences between extracts according to temperature (above the histograms) and according to cycles (above the lines) (One-way ANOVA or Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

the temperature for both seaweeds. Some significant differences were exhibited for the extract of *A. nodosum*: between 1CR and 2CR, 1CR and 3C, 3CR and 1C/2C/2CR (One-way ANOVA, $p < 0.05$). Regarding *H. siliquosa*, significant differences were found between 2CR and 2C/3C, 2C and 5CR (One-way ANOVA, $p < 0.05$). These differences between cycles did not follow precise trend. The increase in the number of cycles or the implementation of the cell reversal did not increase the TPC for both seaweeds.

The mass extraction yield followed the trend of the TPC for both species: the highest yield was observed for *H. siliquosa* with 53.9 % while *A. nodosum* had a maximum of 27.6 % (with always the same procedure 3CR150; Table 1). When the temperature increased, the yield increased for most cycle, similarly to the TPC. Indeed, the highest yield was obtained at 150°C for the extracts of *A. nodosum* (One-way ANOVA, $p < 0.05$), except for the extract 1CR with no significant difference of yield between the three temperatures tested (One-way ANOVA, $p = 0.052$). Regarding *H. siliquosa*, the highest yield was found at 150°C for the extracts 2CR and 5C (One-way ANOVA, $p < 0.05$) while no difference of yield between 100° and 150°C was exhibited for the extracts 3C and 3CR (One-way ANOVA, $p > 0.05$). Finally, no significant difference of yield was exhibited between temperatures for the extract 2C (Kruskal-Wallis, $p = 0.270$). Similarly to the TPC, the yield obtained for the extract with

different numbers of cycles did not show a specific trend. The temperature and the number of cycles which allow to obtain high TPC and yield were 150°C for both seaweeds, and the smallest number of cycles, i.e. one cycle for *A. nodosum* and two cycles for *H. siliquosa*, because there was no effect of the number of cycles at the same temperature.

Antioxidant activities of ASE extracts

According to the DPPH test, *H. siliquosa* showed better radical scavenging activities than *A. nodosum*, with the most interesting concentration being 0.15 mg.mL⁻¹ for the former and 0.30 mg.mL⁻¹ for the latter (Figure 3). Moreover, the IC₅₀ of the extracts from *H. siliquosa*, varying from 0.15 to 0.22 mg.mL⁻¹, were close to some positive controls (vitamins C, E and BHA) with generally no significant difference in activities (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). For *A. nodosum*, the extracts were less active than positive controls. On the contrary of TPC and yield, the temperature did not affect as much the radical scavenging activity determined by DPPH test. For *A. nodosum*, only a significant difference was highlighted between 100° and 150°C for the extract 2CR with the highest radical scavenging activity obtained with 150°C (Kruskal-Wallis, $p = 0.031$). The temperature had no impact on radical scavenging activities.

Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale

Table 1: ASE extraction yield (%) for *Ascophyllum nodosum* (A) and *Halidrys siliquosa* (B) with different cycles (1C = 1 cycle, 1CR = 1 cycle with cell turn over, 2C = 2 cycles, etc.) and temperatures (75°, 100° and 150°C). Letters indicate differences between extracts according to temperature for each cycle (On-way ANOVA, $p < 0.05$).

A			B		
Cycle	Temperature	Yield (%)	Cycle	Temperature	Yield (%)
1C	75	10.9 ± 0.2 <i>c</i>	2C	75	28.4 ± 4.1 <i>a</i>
	100	13.2 ± 0.4 <i>b</i>		100	35.6 ± 0.9 <i>a</i>
	150	16.5 ± 1.3 <i>a</i>		150	34.0 ± 8.9 <i>a</i>
1CR	75	13.8 ± 0.4 <i>a</i>	2CR	75	38.3 ± 0.6 <i>b</i>
	100	13.1 ± 4.1 <i>a</i>		100	40.5 ± 0.4 <i>b</i>
	150	22.5 ± 1.1 <i>a</i>		150	49.5 ± 2.5 <i>a</i>
2C	75	8.4 ± 3.9 <i>b</i>	3C	75	33.2 ± 0.8 <i>b</i>
	100	13.0 ± 1.3 <i>b</i>		100	37.1 ± 1.0 <i>ab</i>
	150	19.2 ± 0.7 <i>a</i>		150	38.9 ± 3.2 <i>a</i>
2CR	75	20.9 ± 0.6 <i>b</i>	3CR	75	36.5 ± 3.4 <i>b</i>
	100	22.2 ± 1.1 <i>b</i>		100	40.3 ± 0.8 <i>ab</i>
	150	26.4 ± 0.3 <i>a</i>		150	53.9 ± 9.6 <i>a</i>
3C	75	15.8 ± 0.7 <i>c</i>	5C	75	35.2 ± 1.7 <i>b</i>
	100	19.0 ± 1.1 <i>b</i>		100	32.6 ± 0.6 <i>b</i>
	150	24.7 ± 0.3 <i>a</i>		150	48.0 ± 0.4 <i>a</i>
3CR	75	22.0 ± 1.2 <i>b</i>	5CR	75	38.7
	100	20.6 ± 0.7 <i>b</i>		100	42.5
	150	27.6 ± 0.6 <i>a</i>		150	30.9

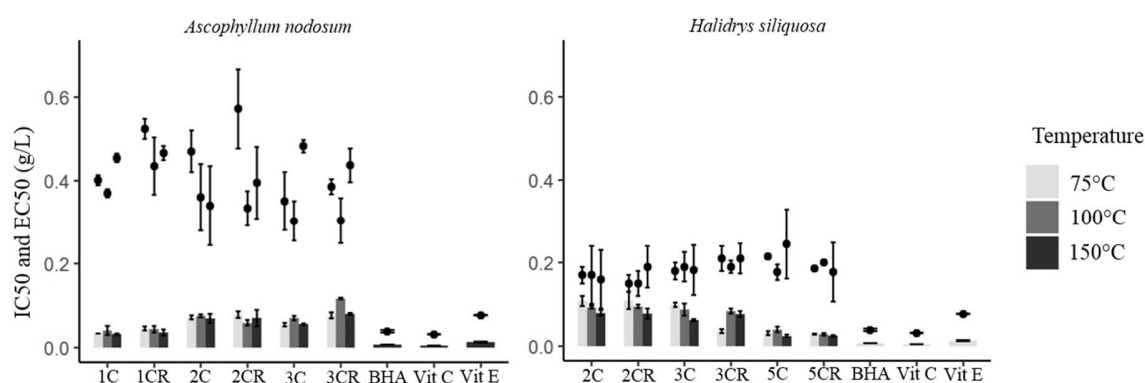


Figure 3: Radical scavenging and antioxidant activities from two different colorimetric tests, DPPH (IC₅₀) represented by points and FRAP (EC₅₀) represented by histograms, of extracts obtained by ASE with different cycles (1C = 1 cycle, 1CR = 1 cycle with cell turn over, 2C = 2 cycles, etc.) and temperatures (75°, 100° and 150°C) for *Ascophyllum nodosum* (on the left) and *Halidrys siliquosa* (on the right). Statistical results showed on Supplementary data.

Similarly to TPC and yield, the number of cycle did not influence with a specific trend the radical scavenging activities. However, significant differences were highlighted between the extract 1CR and the extracts 2C, 3C and 3CR suggesting that a low number of cycle allowed high radical scavenging activities.

According to the FRAP test, profiles between both seaweeds were different compared to the previous test (Figure 3). For *A. nodosum*, the EC50 was closer to the positive controls with the extract 1C rather than the extract 5CR of *H. siliquosa* with 0.032 mg.mL⁻¹ at 75°C and 0.024 mg.mL⁻¹ at 150°C respectively. As for the radical scavenging activity, the temperature did not affect the antioxidant activity determined by FRAP assay for the extracts 1C, 1CR and 2C for *A. nodosum*. However, significant differences were found between 100° and 150°C for the extracts 2CR, 3 and 3CR (Kruskal-Wallis, $p = 0.001$, $p = 0.003$ and $p < 0.001$ respectively) with the highest antioxidant activity obtained at 150°C for the extracts 3C and 3CR, and at 100°C for the extract 2CR. For *H. siliquosa*, the temperature did not affect the antioxidant activity for the extracts 2C and 5CR. However, differences in antioxidant activity were showed between 75 and 150°C for the extracts 2CR, 3C and 3CR (Kruskal-Wallis, $p = 0.004$, $p = 0.030$ and $p = 0.002$ respectively) with the highest antioxidant activity obtained at 150°C for the extracts 2CR and 3C, and 75°C for the extract 3CR. A significant difference was also highlighted between 75° and 100°C for the

extract 3CR and between 100° and 150°C for the extract 5C with the highest antioxidant activity obtained at 75° and 150°C respectively (Kruskal-Wallis, $p < 0.001$ for both). Finally the temperature did not have a real impact on or allowed highest antioxidant activities at 150°C. About the effect of the number of cycles on the antioxidant activity determined by FRAP assay, for *A. nodosum*, the extracts 1C and 1CR were significantly different from the extracts 2C, 2CR, 3C and 3CR (Kruskal-Wallis, $p < 0.001$) with better activities with the lowest number of cycles. On the contrary, the extracts 2C and 2CR of *H. siliquosa* were significantly different from the extracts 3CR, 5C and 5CR with better activities with the highest number of cycles (Kruskal-Wallis, $p < 0.01$). In the same way, a significant difference was found between 3C and 5C, 3CR and 5C/5CR (Kruskal-Wallis, $p < 0.002$).

Photoprotective sunscreen activities of ASE extracts

The extracts from *A. nodosum* showed no photoprotective activity (data not shown). Similarly to TPC and yield, the highest SPF and PF-UVA for *H. siliquosa* was obtained at 150°C and was significantly different to the values at 75° and 100°C (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) except for 2CR with no difference in SPF and PF-UVA between temperatures (Kruskal-Wallis, $p = 0.071$ and $p = 0.061$ respectively) (Table 2). The highest SPF and PF-UVA were 2.33 and 1.85 respectively for the extract 2C150. No significant difference was observed between the values of SPF and PF-UVA obtained at 75° and 100°C whatever the number of

cycles except for the extract 5CR (Kruskal-Wallis, $p = 0.043$ for both).

Table 2: Photoprotective activities as SPF and PF-UVA from *Halidrys siliquosa* ASE extracts obtained with different cycles (1C = 1 cycle, 1CR = 1 cycle with cell turn over, 2C = 2 cycles, etc.) and temperatures (75°, 100° and 150°C). Maximal values are written in bold for SPF and PF-UVA. Letters indicate differences between extracts according to temperature for each cycles (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

Number of cycle	Temperature (°C)	SPF	PF-UVA
2C	75	1.32 ± 0.04 <i>b</i>	1.12 ± 0.04 <i>b</i>
	100	1.29 ± 0.05 <i>b</i>	1.17 ± 0.03 <i>b</i>
	150	2.33 ± 0.46 <i>a</i>	1.85 ± 0.20 <i>a</i>
2CR	75	1.30 ± 0.06 <i>a</i>	1.19 ± 0.04 <i>a</i>
	100	1.22 ± 0.02 <i>a</i>	1.12 ± 0.01 <i>a</i>
	150	1.57 ± 0.40 <i>a</i>	1.27 ± 0.21 <i>a</i>
3C	75	1.29 ± 0.04 <i>b</i>	1.18 ± 0.03 <i>b</i>
	100	1.41 ± 0.06 <i>b</i>	1.24 ± 0.04 <i>b</i>
	150	1.93 ± 0.49 <i>a</i>	1.57 ± 0.40 <i>a</i>
3CR	75	1.24 ± 0.03 <i>b</i>	1.13 ± 0.02 <i>b</i>
	100	1.31 ± 0.03 <i>b</i>	1.17 ± 0.02 <i>b</i>
	150	2.17 ± 0.15 <i>a</i>	1.65 ± 0.13 <i>a</i>
5C	75	1.26 ± 0.03 <i>b</i>	1.14 ± 0.02 <i>b</i>
	100	1.36 ± 0.07 <i>b</i>	1.22 ± 0.04 <i>b</i>
	150	2.23 ± 0.28 <i>a</i>	1.67 ± 0.21 <i>a</i>
5CR	75	1.53 ± 0.07 <i>b</i>	1.31 ± 0.05 <i>b</i>
	100	1.21 ± 0.05 <i>c</i>	1.10 ± 0.04 <i>c</i>
	150	2.30 ± 0.12 <i>a</i>	1.72 ± 0.07 <i>a</i>

Anti-aging activities of ASE extracts

Anti-aging activities were evaluated by elastase and tyrosinase inhibitions on six extracts obtained by ASE: 1C at 75, 100 and 150°C for *A. nodosum* and 2C at 75, 100 and 150°C for *H. siliquosa*. Anti-elastase activity of extracts of *A. nodosum* was better than the positive control, EGCG (Table 3) at the same concentration. However, the extracts

showed less tyrosinase inhibition than the positive control, kojic acid. About the anti-elastase activity, *H. siliquosa* extracts showed less activity than extracts from *A. nodosum* while a higher tyrosinase inhibition was showed at 75 and 150°C. Compared to the positive controls, extracts from *H. siliquosa* were almost similar for anti-elastase activity and less active for anti-tyrosinase activity.

Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale

Table 3: Anti-aging activities of 3 extracts of *Ascophyllum nodosum* (An 1C75, 1C100 and 1C150) and *Halidrys siliquosa* (Hs 2C75, 2C100 and 2C150) determined by elastase and tyrosinase inhibitions. Epigallocatechin gallate (EGCG) and kojic acid are positive controls.

Anti-aging activities	Extract or control	Concentrations (mg.mL ⁻¹)	% of inhibition	
Elastase inhibition	EGCG	1	19.44	
	An	1C75	1	57.89
		1C100	1	80.46
		1C150	1	47.39
	Hs	2C75	1	20.60
		2C100	1	14.54
		2C150	1	29.95
Tyrosinase inhibition	Kojic acid	0.1	93.46	
	An	1C75	0.1	33.33
		1C100	0.1	12.43
		1C150	0.1	2.48
	Hs	2C75	0.1	15.94
		2C100	0.1	0.00
		2C150	0.1	42.51

Correlation between phenolic compounds and activities for ASE extracts

Three positive correlations were found for *A. nodosum* with only two which were statistically significant: the strongest correlation was observed between TPC and extraction yield ($r = + 0.794$, $p < 0.001$) followed by the correlation between the yield and the antioxidant activity determined by the FRAP assay (EC50; $r = + 0.573$, $p = 0.013$) (Figure 4). In contrast, three negative correlations were noticed with only one which was statistically significant: between the TPC and the radical scavenging activity determined by the DPPH assay (IC50; $r = - 0.579$, $p = 0.012$).

For *H. siliquosa*, nine positive and six negative correlations were found with only four statistically significant (Figure 4). The strongest positive correlation was obtained between the two

photoprotective activities, SPF and PF-UVA with a r coefficient equals to $+ 0.991$ ($p < 0.001$). Similarly to *A. nodosum*, a strong positive correlation was highlighted between TPC and yield ($r = + 0.817$, $p < 0.001$). Two others significant correlations were observed between the yield and the radical scavenging activity ($r = + 0.481$, $p = 0.043$), and between the two antioxidant activities ($r = - 0.624$, $p = 0.006$).

Semi-purification of ASE extracts using SPE procedure

The SPE semi-purification procedure was carried out on two extracts obtained by ASE: 1C150 for *A. nodosum* and 2C150 for *H. siliquosa*. The signal of phenolic compounds on ¹H NMR analyses was found on two fractions for *A. nodosum*, hydroethanolic (Water:EtOH) and ethanolic (EtOH) fractions, and three fractions for *H. siliquosa*,

hydroethanolic, ethanolic and dichloromethane-ethanolic (EtOH:DCM) fractions (Figure 5). For *A. nodosum*, the shape profile was almost similar on both fractions and a signal at 6.4 ppm was only present for the Water:EtOH fraction. This peak was also found on the profile of the ASE crude extract. The NMR profiles of *H. siliquosa* SPE fractions were different: like for *A. nodosum*, Water:EtOH fraction looked like ASE extract. However, the shape profile was completely different for the two other fractions but similar to each other. On the Figure 6, the TPC was expressed as $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry fraction which allows to show or not a concentration of phenolics compared to the crude ASE extract. For *A. nodosum*, the highest TPC was found within the EtOH fraction with $237 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry fraction while

for *H. siliquosa* it was the Water:EtOH fraction with $383 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry fraction (Figure 6, at the top). The semi-purification allowed to concentrate the phenolic compounds by 1.8 for *A. nodosum* and 2 for *H. siliquosa*. The radical scavenging activities according to the DPPH test were closer to the positive controls for the EtOH fraction of *A. nodosum* ($0.13 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and the Water:EtOH and EtOH fractions of *H. siliquosa* ($0.09 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for both; Figure 6, at the bottom). Even if activities were not significantly different (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$), the EtOH fraction of *A. nodosum* appeared to have a better radical scavenging activity than its ASE extract ($0.37 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). The difference between the extract and the semi-purified fractions was not as strong with *H. siliquosa*.

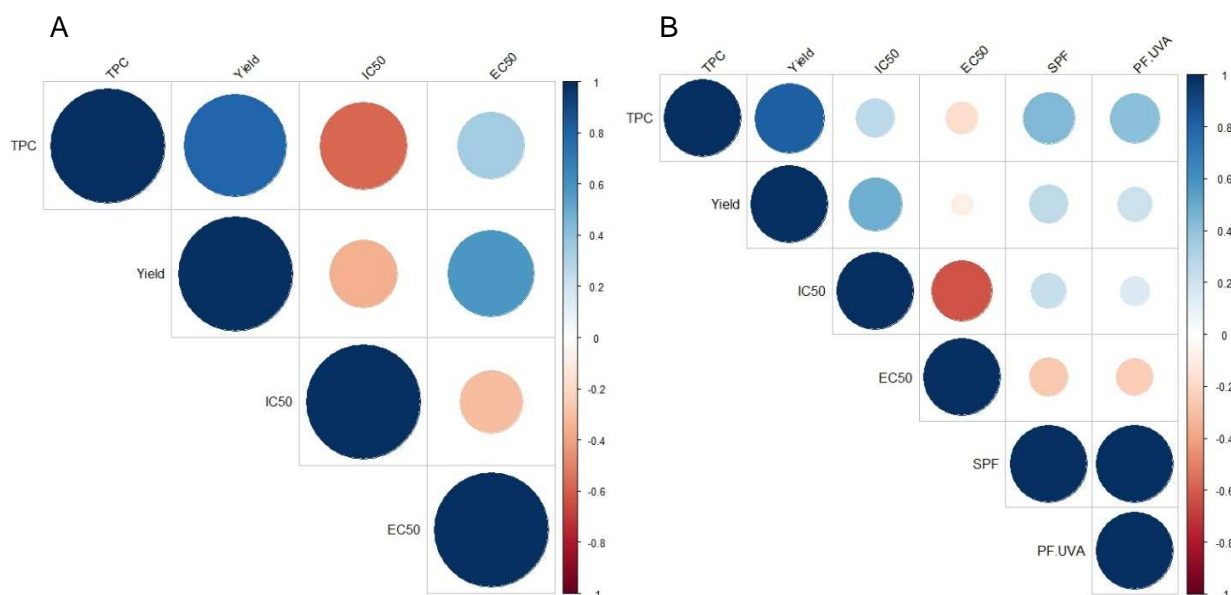


Figure 4: Correlations between TPC, radical scavenging activities (DPPH=IC50), antioxidant activities (FRAP=EC50) for *Ascophyllum nodosum* (A) and *Halidrys siliquosa* (B) and photoprotective activities (SPF and PF-UVA) for *Halidrys siliquosa* (B). Positive correlations are displayed in blue and negative correlations in red. The intensity of the color and the size of the circles are proportional to the correlation coefficients (Pearson correlation).

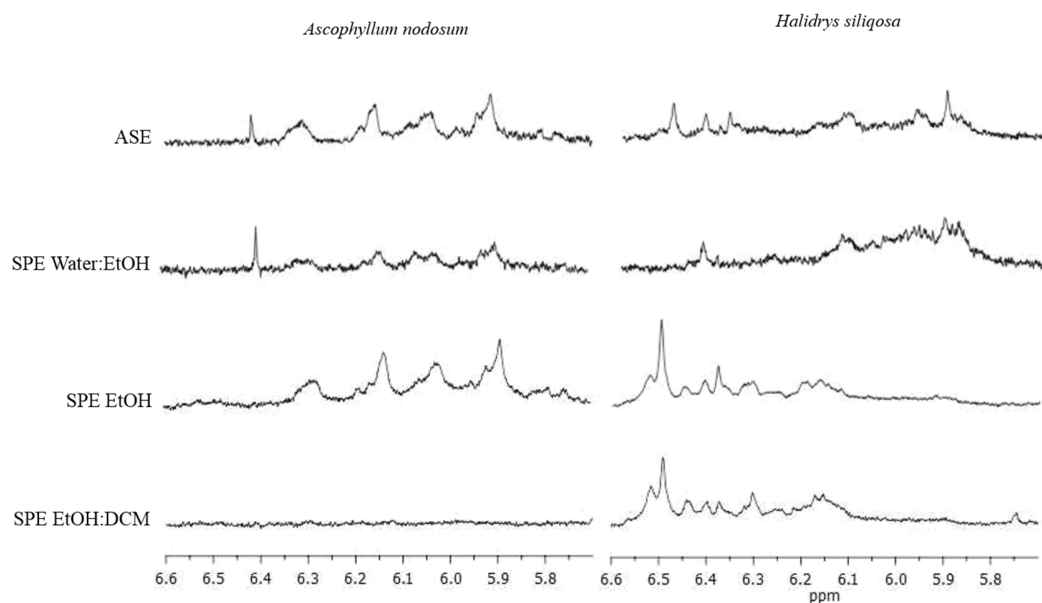


Figure 5: ¹H NMR profiles, zoomed on the zone of phenolics between 5.7 and 6.6 ppm, of SPE fractions carried out on ASE extracts 1C150 for *Ascophyllum nodosum* (on the left) and 2C150 for *Halidrys siliquosa* (on the right).

According to the FRAP test, Water:EtOH and EtOH fractions from *A. nodosum* and *H. siliquosa* were close to positive controls (Vitamins C and E, BHA) with 0.04 and 0.03 mg.mL⁻¹ for the first seaweed, and 0.008 and 0.03 mg.mL⁻¹ for the second seaweed, respectively. For both species, values of antioxidant activity for the SPE fractions were not statistically different except between Water and Water:EtOH fractions for *H. siliquosa* with the highest antioxidant activity for Water:EtOH fraction (Kruskal-Wallis, $p = 0.028$).

Semi-purification made it possible to obtain fraction with photoprotective activity for *A. nodosum* whereas there was no activity for its crude ASE extract. Indeed, the EtOH fraction showed SPF and PF-UVA of 1.42 and 1.29 respectively (Table 2-S2, supplementary data). However, regarding *H. siliquosa*, enriched fractions (Water:EtOH and EtOH fractions) had significantly

lower SPF and PF-UVA compared to the crude ASE extract (Kruskal-Wallis, $p < 0.005$).

Discussion

Our study dealt with the effect of different extraction parameters of ASE (temperature and number of cycles) on the phenolic content and associated bioactivities.

Impact of the number of ASE cycles

The number of cycles increase the extraction time involving the extraction of different compounds or increasing the quantity of specific compounds. In order to see the impact on TPC, different numbers of cycles were tested in this study: 1, 2 and 3 cycles for *A. nodosum* and 2, 3 and 5 cycles for *H. siliquosa*, with the cell turned over or not in both species. The extraction time for one cycle was always the same: 5 min. In the literature, 1 cycle with 20 min at 1500 psi was the extraction protocol currently used (Plaza et al., 2010; Herrero et al.,

2010; Tanniou et al., 2013). Moreover Onofrejšová et al. (2010) decided to test extraction on *Porphyra tenera* and *Undaria pinnatifida* with 3 cycles (5 min each) and a mixture of hexane/acetone to eliminate water insoluble compounds and other pigments followed by another extraction with 80% methanol and 2 cycles (10 min each). The two-step elution was performed at 130°C and 1885 psi. In another study, Zubia et al. (2009) obtained ASE extracts from 4 Fucales, *Bifurcaria bifurcata*,

Cystoseira tamariscifolia, *Fucus ceranoides*, *Halidrys siliquosa* with 2 cycles (7 min each) at 75°C and 1500 psi. Extraction time seems to be the factor having the weaker positive influence compared to temperature on the extraction of phenolic compounds. Indeed, our study showed that there was no significant difference on TPC and associated activities between the different cycles, therefore we suggest the use of only one cycle because it is shorter and less energetic.

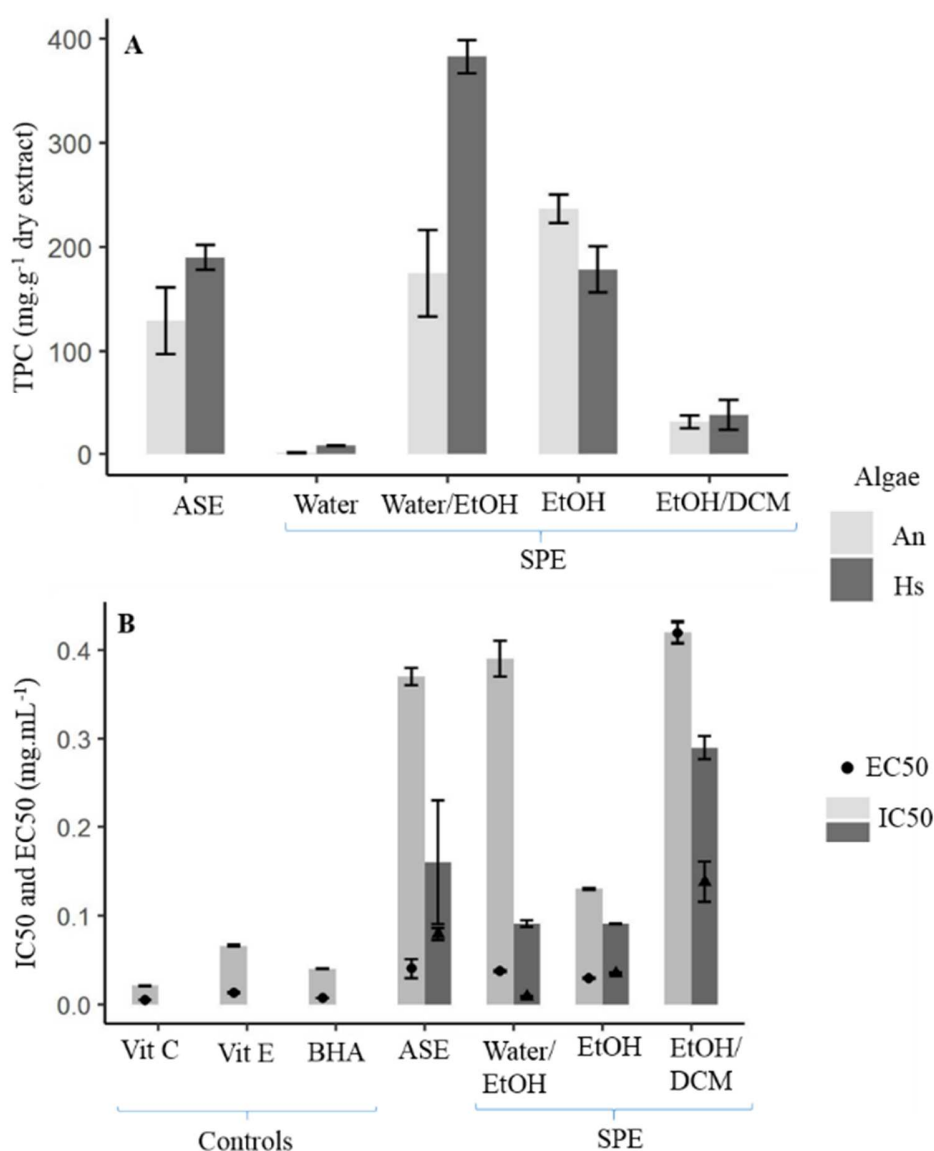


Figure 6: Total phenolic content (TPC) (A), radical scavenging activities (DPPH) and antioxidant activities (FRAP) (B) in 3 or 4 fractions obtained by SPE from ASE extracts of *Ascophyllum nodosum* and *Halidrys siliquosa* (Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$). See statistical results in supplementary data (Table 2-S1).

Impact of the ASE temperature on TPC and yield

According to Kronholm et al. (2007), extraction temperature is the major parameter influencing the physicochemical properties of solvent and extracted compounds. According to several publications, high temperatures are generally more effective to increase extraction yield: Plaza et al. (2010) highlighted that the higher the temperature is (between 50, 100, 150 and 200°C tested), the higher is the extraction yield from *Himanthalia elongata*. Santoyo et al. (2009) and Rodríguez-Meizoso et al. (2010) showed also that the extraction yield of the microalga *Haematococcus pluvialis* increased with the extraction temperature (same temperatures as Plaza et al., 2010). In our study, extracts obtained at 150°C compared to 75 and 100°C, showed also the highest extraction yield. Tierney et al. (2013) showed that extracts obtained through ASE produced a better yield than those obtained through solid-liquid extraction (SLE). Extraction time was shorter for ASE than SLE and temperature and pressure were higher for ASE than SLE causing the extraction of hydrophilic and also some less polar components (Kronholm et al., 2007). In our study, the best extraction yield obtained for *A. nodosum* hydroethanolic extract (obtained with 3 cycles and cell turned over at 150°C) was 27.6 % which was closer to extraction yield of water extract generated at 120°C and 1500 psi (28.7 %) than the hydroethanolic extract generated at 100°C and 1000 psi (11.3 %) of Tierney et al. (2013). However, the yield obtained at 100°C with one or two cycles in our study was in

agreement with this latter percentage: 13.1 and 13.0 % respectively. According to Del Pilar Sánchez-Camargo et al. (2016), the extraction yield obtained for ASE extract after 20 min at 120°C and 1500 psi for a Sargassaceae, *Sargassum muticum*, was 40.1 % which was a little weaker than our best results for the Sargassaceae, *H. siliquosa*, with 53.9 % obtained after 3 cycles with the cell turn over at 150°C.

The temperature can also impact the extraction of bioactive phenolic compounds from brown seaweeds: Tanniou et al. (2013) observed that a temperature between 100° and 150°C was better to yield high amount of phlorotannins from *Sargassum muticum*. Several authors reported the sensitivity of phenolic compounds to temperature. In our study, thermosensitive compounds were apparently not degraded, as Richter (1996) suggested, because the highest TPC was obtained with 150°C for both brown seaweeds. This phenomenon can be explained by an increase in the solubility of the compounds with temperature. Moreover, studies on higher plants showed no difference in TPC from rosemary between 150° and 200°C as the maximum amount of extractable phenolics was already reached at 150°C (Herrero et al., 2010). In our study, the phlorotannin contents of *A. nodosum* extracts (between 80.4 and 132.0 mg.g⁻¹ dry extract - data not shown) were higher than hydroethanolic extract at 100°C and 1000 psi (66.3 mg.g⁻¹ of extract) obtained by Tierney et al. (2013). Temperature and pressure

were similar between both studies. So other reason could explain this difference, like the harvesting sites of algae (i.e. Ireland for Tierney et al., 2013 and Brittany for this study) and environmental variations between sites as it is known that they also have an impact on the phenolic content of seaweeds (Stengel et al., 2011; Le Lann et al., 2012). Zubia et al. (2009) found that TPC of ASE extract obtained with a mixture of dichloromethane and methanol at 75°C and 1500 psi from *Halidrys siliquosa* was 16.0 mg.g⁻¹ of DW, less than this study (between 34.6 and 60.6 mg.g⁻¹ algal DW at 75°C) but with a different solvent. Maybe the mixture using dichloromethane is not the most appropriate solvent to extract phenolic compounds (Plaza et al., 2010). Another Sargassaceae, *Sargassum muticum*, contained TPC using ASE at 120°C and 1500 psi close to 47.6 mg gallic acid equivalent (GAE).g⁻¹ extract (Del Pilar Sánchez-Camargo et al., 2016) which was lower than our best result obtained for *H. siliquosa* (165.0 mg.g⁻¹ of extract; data not shown). However, their results were expressed in gallic acid equivalent which is better found in green and red seaweeds, and which does not correspond to the monomere structuring phlorotannins in brown seaweeds (Ragan and Glombitza, 1986). The use of this different phenolic standard could have an effect on the seaweed TPC calculated from the standard curve from one or the other phenolic compound.

Impact of the ASE temperature on the activities of extracts

Our results showed that the temperature had a lower impact on the radical scavenging activity determined by DPPH compared to TPC. Herrero et al. (2010) showed that the activity by the DPPH method increased with an increase in temperature up to 200°C on rosemary plant. Another study showed higher antioxidant activities of *Himanthalia elongata* extracts obtained when water temperature increased from 50 to 200°C meanwhile ethanol extracts showed their maximum at 100°C compared to 50, 150 or 200°C (Plaza et al., 2010). Between our extracts obtained with different cycle numbers, some showed a more interesting antioxidant activity at 150°C, or even 100°C compared to 75°C. Otherwise, no significant difference was observed. If we compared our results with the literature, our radical scavenging activities were better or close to theirs. Tanniou et al. (2013) showed in *Sargassum muticum* extracts obtained at 120°C and 1500 psi, an IC50 of 0.77 mg.mL⁻¹ with DPPH test which was less active than our results obtained for another Sargassaceae *H. siliquosa* with 0.15 mg.mL⁻¹. In another study Zubia et al. (2009) showed an IC50 close to our results with 0.21 mg.mL⁻¹ (at 75°C and 1500 psi). Between our two seaweed models, *H. siliquosa* extracts presented better radical scavenging activities.

According to the antioxidant activity determined by FRAP assay, the results showed that the temperature had a lower impact as for the radical

scavenging activity. However, the most interesting reducing activity was found at 150°C for some extracts for *A. nodosum* (2CR and 3C) and *H. siliquosa* (3C and 3CR). High reducing activity of the extract of *H. siliquosa* obtained at 75°C, 1500 psi and a mixture of dichloromethane:methanol has already been observed (Zubia et al., 2009). These authors found 72.4% of inhibition at 0.005 mg.mL⁻¹ which correspond to an EC50 of around 0.003 mg.mL⁻¹ which is much active than our best extract showing 0.023 mg.mL⁻¹. They also found interesting activities for two Fucoaceae (same family of *A. nodosum*), *Fucus ceranoides* and *F. serratus*: 66.0 and 43.7 % at 0.02 mg.mL⁻¹ which correspond to EC50 of 0.015 and 0.023 mg.mL⁻¹ respectively. Those results are in agreement with ours obtained for the best extract of *A. nodosum* with an EC50 of 0.023 mg.mL⁻¹.

In our study, the temperature of 150°C allowed to obtain the highest SPF and PF-UVA for *H. siliquosa* with 2.33 and 1.85 respectively. These results were getting closer to those obtain by Le Lann *et al.* (2016) with SPF of 3.55 and PF-UVA value of 2.20 for phlorotannin-enriched fraction of *H. siliquosa*. Our values were close to another solar organic filter like homosalate which presents a SPF greater than 4 (Couteau et al., 2007). Unlike this latter species, *Ascopyllum nodosum* extracts did not show any photoprotective activities.

Our extracts from both seaweeds exhibited anti-aging potentials with anti-elastase and anti-

tyrosinase activities. According to the elastase inhibition, the activity was even higher than the positive control for *A. nodosum* but not for *H. siliquosa*. A previous study found anti-elastase activity of an extract of *Sargassum muticum* obtained after enzyme-assisted extraction (Puspita et al., 2017): authors showed between 21.6 and 32.8 % of elastase inhibition at 1 mg.mL⁻¹ which was less than our results, between 47.4 and 80.5 %.

Both seaweed extracts have then interesting valorization potential for their different biological activities such as antioxidant and anti-aging activities, with photoprotective activity found only in *H. siliquosa*. The temperature appeared to have an impact but not for all extracts. However, the temperature of 150°C was largely dominant for getting the best activities.

Correlation between phenolic content and associated activities

Different correlations were found between phenolic content, yield, and associated activities. In our study, phenolic content was strongly correlated to the extraction yield showing that the extraction was well specific to phenolic compounds. Phenolic compounds could also be responsible for biological activities. In our study, negative correlation was highlighted between TPC and radical scavenging activity (expressed as IC50) for *H. siliquosa* or between yield and radical scavenging activity for *A. nodosum*. This means that the higher the content or the yield was, the lower the IC50 and therefore the better was the activity. Balboa et al. (2013) reviewed some correlations

found between total phenolics and antioxidant activity from seaweeds. Moreover, according to Audibert et al. (2010), radical scavenging activity was correlated with the content of phenolic compounds for *A. nodosum* fractions obtained by ultrafiltration (Pearson's correlation coefficient, $r^2 = 0.93$). Other studies found some negative correlations between the phenolic content and the radical scavenging activity (or the opposite) on crude extracts of brown seaweeds: in *Ecklonia stolonifera* (Kuda & Ikemori, 2009), *Himanthalia elongata*, *Laminaria* sp. (Rajauria et al., 2010), *Sargassum* sp. (Yangthong et al., 2009), *Cystoseira sedoides* (Mhadhebi et al., 2011), *Fucus serratus*, *Ascophyllum nodosum* (Wang et al., 2009) or *Fucus vesiculosus* (Wang et al., 2009, 2012). Those correlations were not found for all brown seaweeds and extracts; sometimes no correlation was found depending on the way of extraction or the solvent used for example. Indeed, Zubia et al. (2009) did not find any correlation between the total phenolic content and the radical scavenging activity of crude extracts from the Fucales *Cystoseira tamariscifolia* or *Fucus ceranoides*.

Zubia et al. (2009) also found no correlation between the total phenolic content and the reducing activity for these two seaweeds, which corresponds to our results. On the contrary, they found this correlation on purified fractions (by Solid Phase Extraction) and in other brown seaweeds: *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira tamariscifolia*, *Fucus ceranoides* and *Halidrys siliquosa* with a r

equals to + 0.836 ($p < 0.01$) (Zubia et al., 2009).

Other studies also found this correlation between TPC and reducing activity: in the crude extract of the Laminariales *Ecklonia stolonifera* with a r coefficient equals to + 0.963 (Kuda & Ikemori, 2009), and also for the purified extract of *Halidrys siliquosa* (Le Lann et al., 2016).

On the other hand, in our study a negative correlation between radical scavenging activity and the reducing activity (FRAP) was highlighted, like in the study of Zubia et al. (2009) which obtained a r coefficient of - 0.880 ($p < 0.01$) for crude extracts of Fucales, like *C. tamariscifolia*, *B. bifurcata* and *F. ceranoides*. The explanation could be due to the fact that those two assays rely on a mechanism of electron/hydrogen donation.

Semi-purification by SPE of ASE extracts

Semi-purification by Solid-Phase Extraction (SPE) was carried out to concentrate phenolic compounds in the seaweed extracts obtained by ASE. This method allowed to get a higher TPC and better reducing activities for both seaweeds, compared with the crude ASE extract. For *H. siliquosa* NMR spectra, different signals observed with the different solvents could be explained by the hypothesis that different structures of phlorotannins were obtained: those more hydrophilic which were extracted with the mixture of water and ethanol; and those with a structure more hydrophobic extracted with 100% ethanol and the mixture of ethanol and dichloromethane. Many other molecules were

eliminated by SPE: for example, lipids were removed from the hydroethanolic fraction and found in the ethanolic fraction and dichloromethane-ethanolic fractions (Suppl. data, Fig. S1). The SPE procedure allowed then to concentrate fractions into phenolic compounds. Indeed, the phenolic content was multiplied by 2 thanks to SPE process for the Water:EtOH fraction of *H. siliquosa* and by 1.8 for the EtOH fraction of *A. nodosum*. Zubia et al. (2009) also used SPE on dichloromethane:methanol ASE extract to concentrate phenolic compounds. For four brown seaweeds, authors showed this concentration: 1.0 % of dry weight (DW) for the ASE crude extract and 13.3 % DW for the SPE water fraction of *Bifurcaria bifurcata*; 5.5 % DW for the ASE crude extract and 41.9 % DW for the SPE hydromethanolic fraction of *Fucus ceranoides*; 10.9 % DW for the ASE crude extract and 25.4 % DW for the SPE water fraction of *Cystoseira tamariscifolia*; and 1.6 % DW for the ASE crude extract and 28.8 % DW for the SPE hydromethanolic fraction of *Halidrys siliquosa*. Rajauria (2018) showed also a concentration of phenolics by 1.6 between a crude methanolic extract obtained by maceration and a SPE methanolic fraction of *Himanthalia elongata* with 178.2 and 279.5 mg GAE.g⁻¹ respectively. They used this SPE process to concentrate phenolic

compounds and that allowed to identify further phlorotannins in the fraction by HPLC-MS.

For the antioxidant activities found in our study, even if SPE fractions showed better activities for both assays, they were not significantly different from the crude ASE extract. However, activities of Water:EtOH and EtOH fractions from *H. siliquosa* and EtOH fraction from *A. nodosum* were similar to positive controls, i.e. BHA, vitamins C and E. In the literature, Onofrejová et al. (2010) have found that antioxidant activities were similar between ASE extract and SPE fractions for the Laminariales *Undaria pinnatifida*. On the contrary, Rajauria (2018) found a better antioxidant capacity (EC50) for the SPE methanolic fraction of *H. elongata* compared to the crude extract with 14.5 and 46.3 µg.mL⁻¹ respectively. This SPE fraction was also better than the positive control, vitamin C.

Finally and interestingly in our study, photoprotective activity appeared for SPE fraction of *A. nodosum* meanwhile this activity decreased for *H. siliquosa*. Maybe, the photoprotective activity could be due to a type of phlorotannins, or the result of a complexation of phlorotannins with other molecules in the crude extract.

Conclusion

ASE is a fast method, automated and that does not require large amounts of solvent compared, for example, to the classical maceration. This study demonstrated the interest of ASE for the extraction of active polyphenols from the two species of concern and more generally for brown seaweeds. For both species, *Ascophyllum nodosum* and *Halidrys siliquosa*, the temperature which permits to obtain the best phenolic content and activities was 150°C when compared to 75° and 100°C. On the contrary, the number of ASE cycles had no impact, so one cycle would be enough to extract high amount of active phenolic compounds. Due to their different biological activities demonstrated in this study, ASE extracts are interesting to be valorized in industrial sectors like cosmetics: radical scavenging, reducing and anti-aging activities for both seaweeds and photoprotective activity for *Halidrys siliquosa*. This study also showed the interest of the semi-purification by SPE to enrich fraction in phenolic compounds. Those enriched fractions could be used to further structurally identify phlorotannins contained in *A. nodosum* and *H. siliquosa* with analytical methods such as a combination of HPLC and mass spectrometry.

Acknowledgments

This work was part of the Ph.D. thesis work carried out by the first author, LG, in the FUI20 applied project RIV-AGE 2.0 of which the Laboratory of Marine Environmental Science (LEMAR UMR 6539) set at the IUEM (UBO, UBL) is a partner. It was supported by UBO, the Brittany region, the

Finistère department and Brest Métropole. A special thanks to Magali Molla and Jean-François Arbona (C-WEED Aquaculture) who supplied the seaweeds and Valentin Foulon who helped with enzymatic assays.

References

- Amsler, C. D. (2012) Chemical ecology of seaweeds. In C. Wiecek & K. Bishof (Eds.) *Seaweed biology. ecological studies (Analysis and synthesis)* (pp 177-188), Volume 219, Springer, Berlin, Heidelberg
- Audibert, L., Fauchon, M., Blanc, N., Hauchard, D., & Ar Gall, E. (2010). Phenolic compounds in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: Distribution and radical-scavenging activities. *Phytochemical Analysis*, 21(5), 399–405. <https://doi.org/10.1002/pca.1210>
- Balboa, E. M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E., & Domínguez, H. (2013). In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1764–1785. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.026>
- Borrás Linares, I., Arráez-Román, D., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7682–7690. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.021>
- Bourgougnon, N. & Stiger-Pouvreau V. (2011) Chemodiversity and bioactivity within red and brown macroalgae along the french coasts, metropole and overseas departments and territories. In S.-K. Kim (Ed.) *Handbook of marine macroalgae: biotechnology and applied phycology* (1st ed., pp 58-105). John Wiley & Sons, Ltd.
- Breton, F., Cérantola, S., & Ar Gall, E. (2011). Distribution and radical scavenging activity of phenols in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae).

Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale

- Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 399(2), 167–172.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.01.002>
- Burel, T., Schaal, G., Grall, J., Le Duff, M., Chapalain, G., Schmitt, B., Gemin, M., Boucher, O. & Ar Gall, E. (2019) Small-scale effects of hydrodynamics on the structure of intertidal macroalgal communities: A novel approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 226.
<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106290>
- Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Wong, L. F., Lianto, F. S., Wong, S. K., Lim, K. K., ... Lim, T. Y. (2008). Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*, 109(3), 477–483.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.016>
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627.
<https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Connan, S., Goulard, F., Stiger, V., Deslandes, E., & Gall, E. A. (2004). Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Botanica Marina*, 47(5), 410–416.
<https://doi.org/10.1515/BOT.2004.057>
- Couteau, C., Pommier, M., Papis, E., & Coiffard, L. J. M. (2007). Study of the efficacy of 18 sun filters authorized in European Union tested in vitro. *Pharmazie*, 62(6), 449–452.
<https://doi.org/10.1691/ph.2007.6.6247>
- Couteau, C., & Coiffard, L. (2016). Seaweed application in cosmetics. *Seaweed in Health and Disease Prevention*, 423–441.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802772-1.00014-2>
- Couteau, C., Philippe, A., Vibet, M. A., Papis, E., & Coiffard, L. (2018). Study of the influence of substrate and spectrophotometer characteristics on the *in vitro* measurement of sunscreens efficiency. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 121(April), 210–217.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.05.010>
- Dizerbo, A. H. & Herpé, E. (2007) *Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique, îles Anglo-Normandes incluses*. Lanerneau : Anaximandre
- Esquivel-Hernández, D. A., Ibarra-Garza, I. P., Rodríguez-Rodríguez, J., Cuéllar-Bermúdez, S. P., Rostro-Alanis, M. de J., Alemán-Nava, G. S., García-Pérez, J. S. & Parra-Saldívar, R. (2017). Green extraction technologies for high-value metabolites from algae: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 11(1), 215–231.
<https://doi.org/10.1002/bbb.1735>
- Geiselman, J. A., & McConnell, O. J. (1981). Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: Chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*. *Journal of Chemical Ecology*, 7(6), 1115–1133.
<https://doi.org/10.1007/BF00987632>
- Hardouin, K., Bedoux, G., Burlet, A. S., Donnay-Moreno, C., Bergé, J. P., Nyvall-Collén, P., & Bourgougnon, N. (2016). Enzyme-assisted extraction (EAE) for the production of antiviral and antioxidant extracts from the green seaweed *Ulva armoricana* (Ulvales, Ulvophyceae). *Algal Research*, 16(March), 233–239.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.013>
- Herrero, M. (2010). Green processes for extraction of bioactives from Rosemary. Chemical and functional characterization via UPLC-MS/MS and in-vitro assays, 1217(16), 2512–2520.
- Jennings, J. G., & Steinberg, P. D. (1997). Phlorotannins versus other factors affecting epiphyte abundance on the kelp *Ecklonia radiata*. *Oecologia*, 109(3), 461–473.
<https://doi.org/10.1007/s004420050106>
- Kronholm, J., Hartonen, K., & Riekkola, M. L. (2007). Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(5), 396–412.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.03.004>
- Kuda, T., & Ikemori, T. (2009). Minerals, polysaccharides and antioxidant properties of aqueous solutions obtained from macroalgal beach-casts in the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan.

Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale

- Food Chemistry*, 112(3), 575–581. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.008>
- Le Lann, K., Surget, G., Couteau, C., Coiffard, L., Cérantola, S., Gaillard, F., Larnicol, M., Zubia, M., Guérard, F., Poupart, N. & Stiger-Pouvreau, V. (2016). Sunscreen, antioxidant, and bactericide capacities of phlorotannins from the brown macroalga *Halidrys siliquosa*. *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3547–3559. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0853-0>
- Lim, T. Y., Lim, Y. Y., & Yule, C. M. (2009). Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species. *Food Chemistry*, 114(2), 594–599. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.093>
- Mhadhebi, L., Laroche-Clary, A., Robert, J., & Bouraoui, A. (2011). Antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative activities of organic fractions from the Mediterranean brown seaweed *Cystoseira sedoides*. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 89(12), 911–921. <https://doi.org/10.1139/Y11-093>
- Mesnildrey, L., Jacob, C., Frangoudes, K., Reunavot, M., & Lesueur, M. (2012). *Seaweed industry in France. Report Interreg program NETALGAE*. https://doi.org/10.1002/978-1-4614-3348-4_35
- Michalak, I., & Chojnacka, K. (2014). Algal extracts: Technology and advances. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 581–591. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400139>
- Montero, L., Sánchez-Camargo, A. P., García-Cañas, V., Tanniou, A., Stiger-Pouvreau, V., Russo, M., Rastrelli, L., Cifuentes, A., Herrero, M. & Ibáñez, E. (2016). Anti-proliferative activity and chemical characterization by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry of phlorotannins from the brown macroalga *Sargassum muticum* collected on North-Atlantic coasts. *Journal of Chromatography A*, 1428, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.053>
- Onofrejová, L., Vašíčková, J., Klejdus, B., Stratil, P., Mišurcová, L., Kráčmar, S., Kopecký, J. & Vacek, J. (2010). Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.027>
- O'Sullivan, A. M., O'Callaghan, Y. C., O'Grady, M. N., Hayes, M., Kerry, J. P., & O'Brien, N. M. (2013). The effect of solvents on the antioxidant activity in Caco-2 cells of Irish brown seaweed extracts prepared using accelerated solvent extraction (ASE®). *Journal of Functional Foods*, 5(2), 940–948. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.02.007>
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Herrero, M., Señorans, F. J., & Ibáñez, E. (2010). Screening for bioactive compounds from algae. *Advanced Biofuels and Bioproducts*, 9781461433, 833–872. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3348-4_35
- Poojary, M. M., Barba, F. J., Aliakbarian, B., Donsi, F., Pataro, G., Dias, D. A., & Juliano, P. (2016). Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Marine Drugs*, 14(11), 1–34. <https://doi.org/10.3390/md14110214>
- Puspita, M., Deniel, M., Widowati, I., Radjasa, O., Douzenel, P., Bedoux, G., & Bourgougnon, N. (2017). Antioxidant and antibacterial activity of solid-liquid and enzyme-assisted extraction of phenolic compound from three species of tropical *Sargassum*. *WSEAS Transactions on Systems and Control*, 55, 533–539. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/755/1/011001>
- Ragan & Glombitza (1986) Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progress in phycological research*, 4, 527-534
- Rajauria, G., Jaiswal, A. K., Abu-Ghannam, N., & Gupta, S. (2010). Effect of hydrothermal processing on colour, antioxidant and free radical scavenging capacities of edible Irish brown seaweeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(12), 2485–2493. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02449.x>
- Rajauria, G. (2018). Optimization and validation of reverse phase HPLC method for qualitative and quantitative assessment of polyphenols in

Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale

- seaweed. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 148, 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.10.002>
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N., & Pohl, C. (1996). Accelerated Solvent Extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033–1039. <https://doi.org/10.1021/ac9508199>
- Rodríguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Señorans, F. J., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2010). Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 456–463.
- Sallenave, J. M., Xing, Z., Simpson, A. J., Graham, F. L., & Gaudie, J. (1998). Adenovirus-mediated expression of an elastase-specific inhibitor (elafin): A comparison of different promoters. *Gene Therapy*, 5(3), 352–360. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300610>
- Sánchez-Camargo, A. D. P., Montero, L., Stiger-Pouvreau, V., Tanniou, A., Cifuentes, A., Herrero, M., & Ibañez, E. (2016). Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae. *Food Chemistry*, 192(July), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.098>
- Santana, C. M., Ferrera, Z. S., Padrón, M. E. T., & Rodríguez, J. J. S. (2009). Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: New approaches. *Molecules*, 14(1), 298–320. <https://doi.org/10.3390/molecules14010298>
- Santoyo, S., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Señorans, F. J., & Ibañez, E. (2009). Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT - Food Science and Technology*, 42(7), 1213–1218. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.01.012>
- Shalaby, E. (2011). Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signaling & Behavior*, 6(9), 1338–1350. <https://doi.org/10.4161/psb.6.9.16779>
- Stengel, D. B., Connan, S., & Popper, Z. A. (2011). Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*, 29(5), 483–501. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.016>
- Stengel, D. B., & Connan, S. (2015). Marine algae: a source of biomass for biotechnological applications. In D. B. Stengel & S. Connan (Eds.), *Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols* (Vol. 1308, pp. 103–108). Springer Science+Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2684-8>
- Stiger-Pouvreau, V., Jégou, C., Cérantola, S., Guérard, F., & Le Lann. (2014). Phlorotannins in Sargassaceae Species from Brittany (France): Interesting Molecules for Ecophysiological and Valorisation Purposes. In N. Bourgougnon (Ed.), *Advances in Botanical Research* (1st ed., pp. 379–411). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374711-2.00705-1>
- Stiger-Pouvreau, V., & Guérard, F. (2018). Bio-inspired molecules extracted from marine macroalgae: a new generation of active ingredients for cosmetics and human health. In S. La Barre & S. S. Bates (Eds.), *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules* (pp. 709–746). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Surget, G., Stiger-Pouvreau, V., Le Lann, K., Kervarec, N., Couteau, C., Coiffard, L. J. M., ... Poupard, N. (2015). Structural elucidation, in vitro antioxidant and photoprotective capacities of a purified polyphenolic-enriched fraction from a saltmarsh plant. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 143, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.12.018>
- Swanson, A. K., & Druehl, L. D. (2002). Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquatic Botany*, 73(3), 241–253. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(02\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(02)00035-9)
- Tanniou, A., Esteban, S. L., Laurent, V., Ibanez, E., Jose A., M., Cérantola, S., Kervarec, N., La Barre, S., Marchal, L. & Stiger-Pouvreau, V. (2013). Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using

Sargassum muticum as model. *Talanta*, 104, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.088>

Tanniou, A., Vandanjon, L., Incera, M., Serrano Leon, E., Husa, V., Le Grand, J., Nicolas, J.-L., Poupart, N., Kervarec, N., Engelen, A., Walsh, R., Guérard, F., Bourgougnon, N. & Stiger-Pouvreau, V. (2014). Assessment of the spatial variability of phenolic contents and associated bioactivities in the invasive alga *Sargassum muticum* sampled along its European range from Norway to Portugal. *Journal of Applied Phycology*, 26(2), 1215–1230. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0198-x>

Tierney, M. S., Smyth, T. J., Hayes, M., Soler-Vila, A., Croft, A. K., & Brunton, N. (2013). Influence of pressurised liquid extraction and solid-liquid extraction methods on the phenolic content and antioxidant activities of Irish macroalgae. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 860–869. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12038>

Turner, C. & Waldebäck, M. (2010) PRinciples of pressurized fluid extraction and environmental, food and agricultural applications. In S.H. Rizvi (Eds.), *Separation, extraction and concentration in the food, beverage and nutraceutical industries*. Food Science (pp. 39-70), Technology and Nutrition, WoodHead Publishing Series

Wang, T., Jónsdóttir, R., & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116(1), 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.041>

Yangthong, M., Hutadilok-Tawatana, N., & Phromkunthong, W. (2009). Antioxidant activities of four edible seaweeds from the Southern coast of Thailand. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(3), 218–223. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0127-y>

Zubia, M., Fabre, M. S., Kerjean, V., Lann, K. L., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., & Deslandes, E. (2009). Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chemistry*, 116(3), 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.025>

Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale

Supplementary data

Table S1: *P*-values obtained with statistical tests (Post-hoc after a Kruskal-Wallis test) applied on the SPE fractions for (A) the Total Phenolic Content (=TPC), (B) radical scavenging activity by DPPH assay expressed as IC50, and (C) antioxidant activity by FRAP assay expressed as EC50 of *Ascophyllum nodosum* (first number) and *Halidrys siliquosa* (second number), respectively. Significant values ($p < 0.05$) are written in bold.

A

TPC	ASE	SPE EtOH	SPE EtOH/DCM	SPE Water
SPE EtOH	0.020 / 1.000	X	X	X
SPE EtOH:DCM	0.430 / 0.156	0.003 / 0.441	X	X
SPE Water	0.181 / 0.045	0.0005 / 0.234	0.996 / 0.996	X
SPE Water:EtOH	0.658 / 0.159	0.616 / 0.415	0.102 / 0.006	0.032 / 0.001

B

IC50	ASE	BHA	SPE EtOH	SPE EtOH/DCM	SPE Water/EtOH	Vit C
BHA	0.314 / 0.091	X	X	X	X	X
SPE EtOH	0.961 / 0.887	0.945 / 0.881	X	X	X	X
SPE EtOH:DCM	0.820 / 0.879	0.036 / 0.020	0.401 / 0.411	X	X	X
SPE Water:EtOH	0.988 / 0.931	0.145 / 0.834	0.744 / 1.000	0.999 / 0.478	X	X
Vit C	0.083 / 0.017	0.999 / 0.999	0.709 / 0.618	0.006 / 0.004	0.036 / 0.548	X
Vit E	0.704 / 0.316	0.999 / 0.995	0.999 / 0.988	0.145 / 0.080	0.401 / 0.970	0.945 / 0.969

C

EC50	ASE	BHA	SPE EtOH	SPE EtOH/DCM	SPE Water/EtOH	Vit C
BHA	0.141 / 0.073	X	X	X	X	X
SPE EtOH	0.799 / 0.858	0.990 / 0.947	X	X	X	X
SPE EtOH:DCM	0.675 / 0.909	0.020 / 0.031	0.208 / 0.454	X	X	X
SPE Water:EtOH	1.000 / 0.274	0.430 / 1.000	0.927 / 1.000	0.916 / 0.106	X	X
Vit C	0.100 / 0.049	1.000 / 1.000	0.979 / 0.916	0.014 / 0.022	0.361 / 1.000	X
Vit E	0.429 / 0.541	1.000 / 0.995	1.000 / 1.000	0.073 / 0.224	0.721 / 1.000	0.996 / 0.990

Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale

Table S2: Photoprotective activities (SPF and PF-UVA) of one SPE fraction for *Ascophyllum nodosum* (An) (EtOH) and two SPE fractions for *Halidrys siliquosa* (Hs) (Water:EtOH and EtOH) compared to the crude ASE extract. Letters indicate differences between fractions for *H. siliquosa* (Kruskal-Wallis, $p < 0.005$).

Seaweeds	Fractions	SPF	PF-UVA
An	ASE 1C150	0	0
	SPE EtOH	1.42 ± 0.04	1.29 ± 0.03
Hs	ASE 2C150	2.33 ± 0.46^a	1.85 ± 0.20^a
	SPE Water:EtOH	1.17 ± 0.01^b	1.10 ± 0.01^b
	SPE EtOH	1.82 ± 0.08^b	1.47 ± 0.05^b

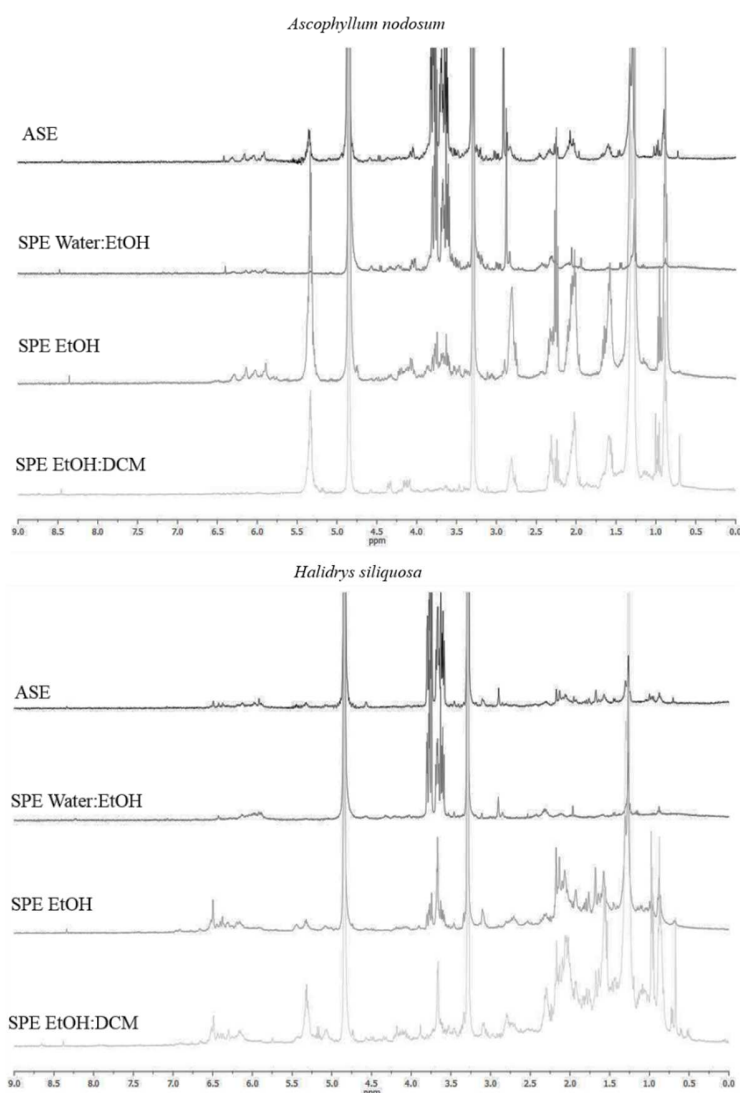


Figure S1: Entire ^1H NMR spectra of SPE fractions from *Ascophyllum nodosum* (on the left) and *Halidrys siliquosa* (on the right) compared to the crude extract ASE.

2.2.2 Purification : la Flash Chromatographie

2.2.2.1 Analyse des composés phénoliques

Une fraction obtenue par flash-chromatographie (FC) s'est démarquée des autres : la fraction EtOH20. En effet, la teneur en composés phénoliques (TCP) obtenue est de l'ordre de $829,6 \text{ mg.g}^{-1}$ d'extrait alors que l'extrait brut contient $332,1 \text{ mg}$ de composés phénoliques. g^{-1} (Figure 2-9). La TCP a été multipliée par 2,5 grâce à la FC. Néanmoins, nous n'avons pas observé de différence significative entre les deux échantillons (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,817$). La fraction EtOH40 contient également une teneur significativement équivalente à l'extrait ASE avec $314,0 \text{ mg.g}^{-1}$ (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,993$). Les autres fractions (H₂O, EtOH60 et Et100) ont montré des TCP plus faibles que l'extrait ASE, significativement différente pour EtOH100 (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,005$).

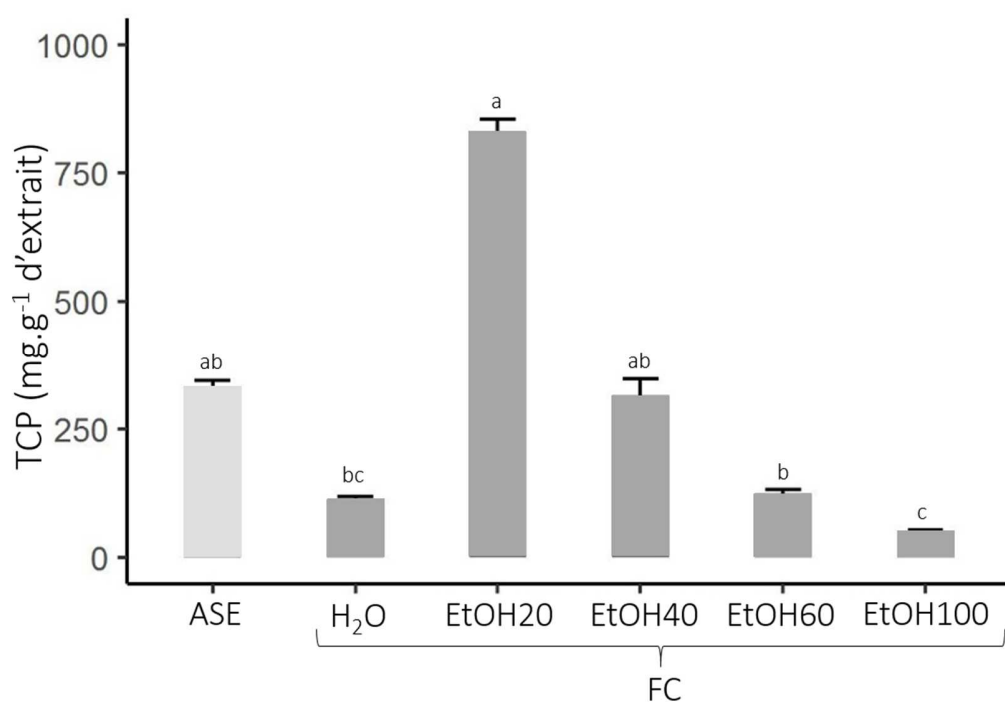


Figure 2-9 : Teneurs en composés phénoliques (TCP, mg.g^{-1} d'extrait sec) des fractions obtenues par Flash-Chromatographie (FC) sur un extrait brut (ASE) d'*Halidrys siliquosa*. Les lettres indiquent une différence significative entre les différentes fractions (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p < 0,05$, $n=3$). H₂O = eau milliQ, EtOH = éthanol (utilisé pur ou dilué dans l'eau milliQ).

Les spectres RMN viennent confirmer le test du Folin-Ciocalteu sur la présence des composés phénoliques (Figure 2-10). Des signaux dans la zone des composés aromatiques (dont les composés phénoliques), entre 6,8 et 5,8 ppm, se retrouvent dans toutes les fractions FC sauf pour la FC-EtOH100 où une très faible quantité de CP avait été détectée par quantification. Le signal des aromatiques est également assez faible pour la fraction FC-H₂O. Si l'on regarde la forme des pics, elle est similaire entre l'extrait brut ASE et la

fraction FC-EtOH20 supposant que les mêmes types de phlorotannins sont présents à la fois dans l'extrait et dans cette fraction. Pour cette dernière, très peu de molécules polaires comme le mannitol (signaux autour de 4 ppm) et de molécules aliphatiques comme les lipides (signaux situés autour de 2 ppm sur le spectre RMN) ont été extraits ; ils se retrouvent principalement dans la fraction aqueuse pour le mannitol et dans les fractions contenant plus d'éthanol (FC-EtOH40 et FC-EtOH60) pour les molécules aliphatiques. Concernant le profil des aromatiques pour la fraction FC-EtOH40, la forme des pics diffère de la fraction FC-EtOH20 et de l'extrait brut, suggérant une extraction d'un type différent de phlorotannins.

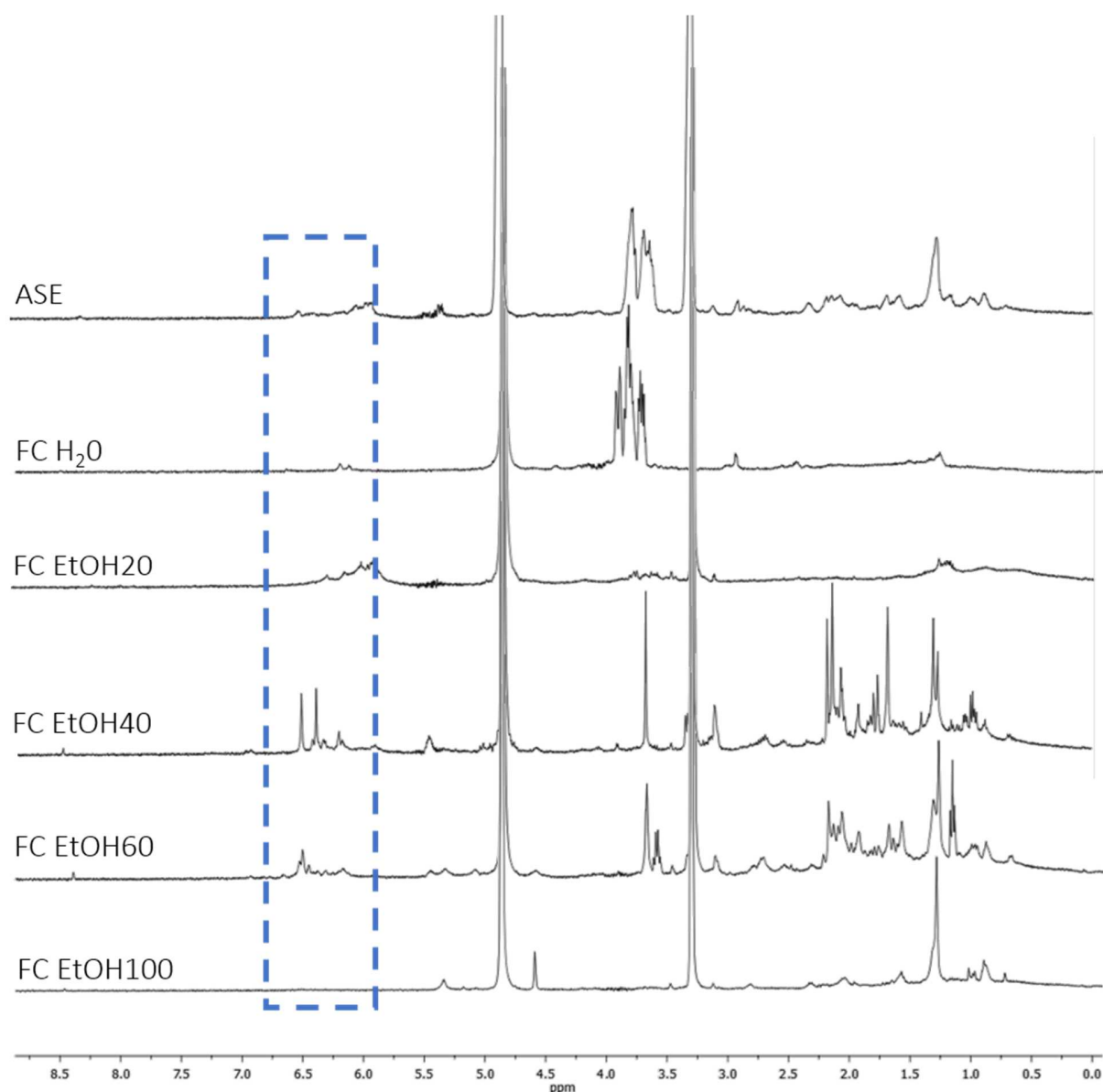


Figure 2-10 : Spectres ^1H RMN des fractions obtenues par Flash-Chromatographie (FC) à partir d'un extrait brut (ASE) d'*Halidrys siliquosa*. H_2O = eau milliQ, EtOH = éthanol. L'encadré bleu représente la zone des composés aromatiques.

2.2.2.2 Activités antioxydantes des fractions semi-purifiées (DPPH et FRAP)

Concernant l'activité antiradicalaire déterminée par le test du DPPH, la fraction EtOH20 a présenté l'activité la plus intéressante : son IC50 est plus faible que l'extrait ASE avec 0,048 et 0,089 mg.mL⁻¹ respectivement (Figure 2-11). Cependant, il n'existe pas de différence significative entre ces deux échantillons (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,503$). D'autre part, l'activité de ces derniers ne diffère pas significativement des contrôles positifs que sont le BHA et les vitamines C et E (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p > 0,05$), signifiant que leur activité est tout aussi intéressante que les antioxydants synthétiques utilisés couramment dans l'industrie. Dès lors que de l'éthanol a été introduit à hauteur de 20% lors de la flash-chromatographie, l'activité antiradicalaire a montré un IC50 plus proche des témoins positifs, avec une différence significative entre la fraction H₂O (0,380 mg.mL⁻¹) et la fraction EtOH20 (0,048 mg.mL⁻¹) (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,038$). Cependant, plus le pourcentage d'éthanol augmente lors de la flash-chromatographie, plus l'activité diminue (IC50 augmente) avec une différence significative entre les fractions EtOH20 et EtOH100 (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,008$).

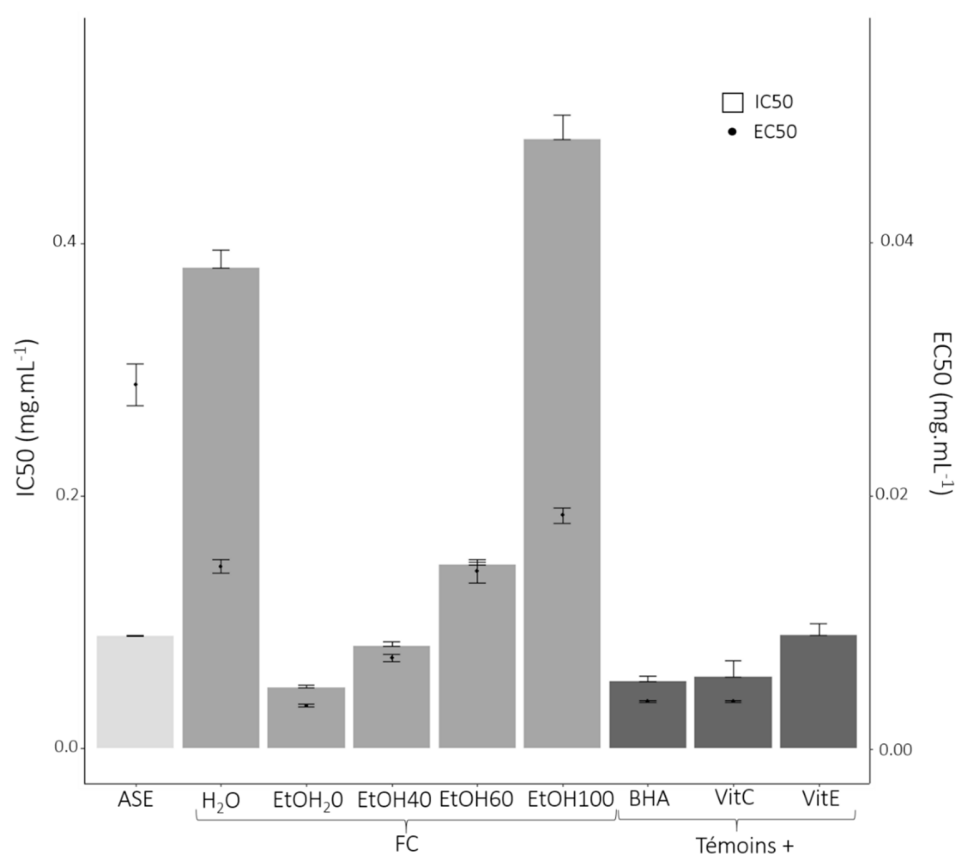


Figure 2-11 : Activités antiradicalaire (DPPH ; IC50 ; mg.mL⁻¹ ; histogramme) et antioxydante (FRAP ; EC50 ; mg.mL⁻¹ ; point) des fractions obtenues par Flash-Chromatographie (FC) à partir d'un extrait brut (ASE) d'*Halidrys siliquosa*. Avec n = 3.

Comme pour l'activité anti-radicalaire, la fraction EtOH20 a présenté l'activité antioxydante, déterminée par le test FRAP, la plus intéressante ($0,003 \text{ mg.mL}^{-1}$) et similaire aux témoins positifs, BHA et vitamine C ($0,004 \text{ mg.mL}^{-1}$ pour les deux témoins positifs) (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,995$ et $p = 0,993$ respectivement) (Figure 2-11). Contrairement à l'activité antiradicalaire, une différence significative a été observée entre l'extrait ASE ($0,029 \text{ mg.mL}^{-1}$) et la fraction la plus antioxydante EtOH20 (Kruskal-Wallis, $p = 0,007$). La tendance est la même que pour l'activité antiradicalaire, avec une perte de l'activité en augmentant le pourcentage d'éthanol et en obtenant une différence significative entre les fractions EtOH20 et EtOH100 (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,039$).

2.2.3 Purification : la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

2.2.3.1 Choix du système de solvants à utiliser

Quatre solutions ont été obtenues avec les 4 mélanges de solvants biphasiques testés (Figure 2-12). Visuellement, la dispersion de l'extrait s'est réalisée d'une manière différente selon les mélanges de solvants. Les deux CCM réalisées sur les phases supérieures et inférieures de ces 4 mélanges biphasiques nous ont donné d'autres indications : pour la première CCM révélée par du DPPH, plus le halo est grand autour du dépôt, plus l'activité anti-radicalaire est élevée (Figure 2-13). Les halos les plus larges ont été retrouvés pour les mélanges 1 et 3, que ce soit dans les phases supérieures ou inférieures.

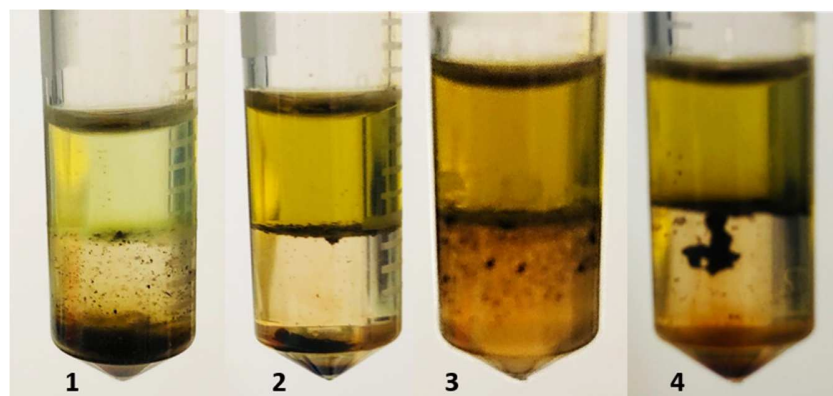


Figure 2-12 : Photographies des 4 mélanges biphasiques réalisés avec l'extrait ASE d'*Halidrys siliquosa* pour déterminer le système optimal de solvants pour la chromatographie de partage centrifuge, par la méthode « shake flask ». 1 = acétate d'éthyle:eau (1:1 ; v:v), 2 = hexane:acétate d'éthyle:méthanol:eau (1:9:2:8 ; v:v), 3 = hexane:acétate d'éthyle:éthanol/eau (1:8:2:7 ; v:v), 4 = heptane:acétate d'éthyle:méthanol:eau (19:1:19:1 ; v:v). A noter une limpidité des phases acétate d'éthyle, contrairement aux phases inférieures.

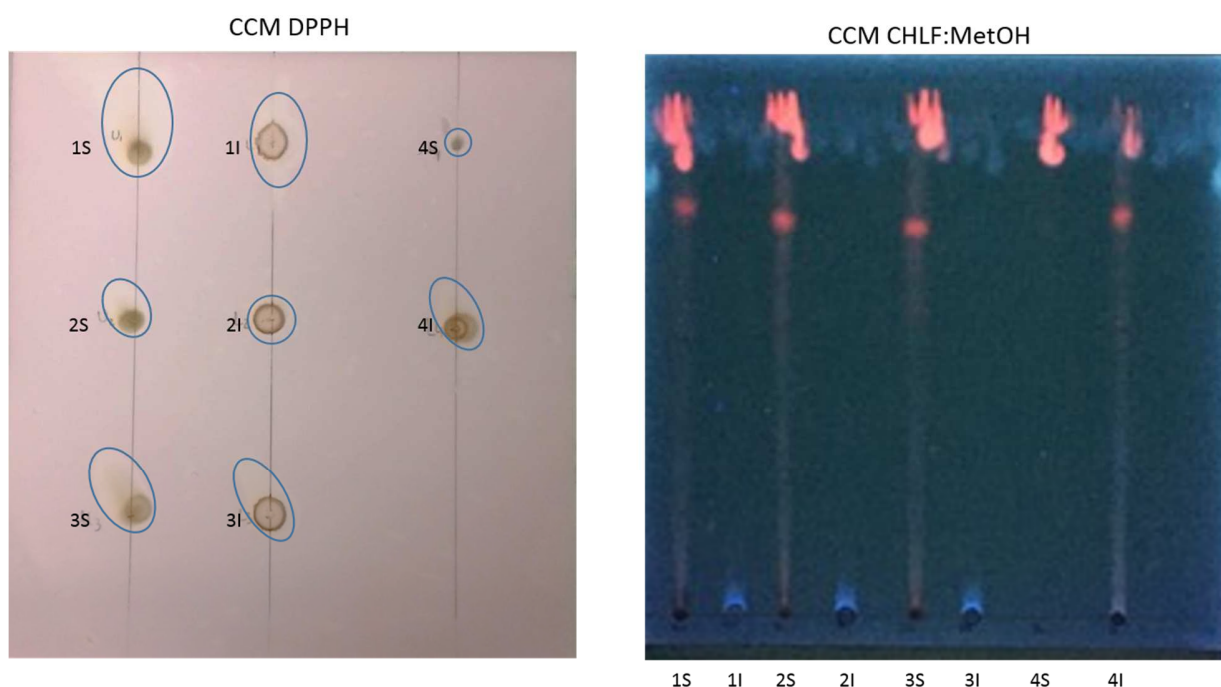


Figure 2-13 : Chromatographies sur Couche Mince (CCM) effectuées sur les phases supérieures et inférieures des 4 solutions biphasiques obtenues avec l'extrait ASE d'*Halidrys siliquosa* (cf Figure 2-12) : une première plaque CCM sur laquelle a été vaporisée une solution de DPPH et une deuxième plaque CCM qui a été éluee dans un mélange chloroforme:méthanol (CHLF:MetOH ; v:v) et révélée à 365 nm. Les cercles bleus sur la 1^{ère} CCM correspondent aux halos autour des dépôts. 1S = phase supérieure de la solution 1, 1I = phase inférieure de la solution 2, 2S = phase supérieure de la solution 2, etc...

Dans cette expérience, nous avons supposé que les composés phénoliques étaient les principales molécules responsables de l'activité anti-radicalaire, donc plus le halo est élevé et large, plus il y aurait de composés phénoliques. Une répartition équitable des halos a été observée pour le mélange 2 (hexane:acétate d'éthyle:méthanol:eau) mais les halos sont moins importants que les mélanges 1 (acétate d'éthyle:eau) et 3 (hexane:acétate d'éthyle:éthanol/eau). Concernant le mélange 4 (heptane:acétate d'éthyle:méthanol:eau), la répartition des halos n'est pas visible et le halo le plus large a été retrouvé dans la phase inférieure de la solution. Concernant la deuxième CCM, comme il n'existe pas de méthodes spécifiques pour les composés phénoliques en CCM, cette méthode utilisée pour les composés aromatiques comme les acides aminés type mycosporine (MAA) révèle des ronds rouges correspondant à ces composés aromatiques. Les différences entre les mélanges sur la deuxième CCM sont plus difficiles à observer. En effet, il n'existe pas de méthode CCM pour permettre l'identification des composés phénoliques mais cela nous donne une indication sur la présence de composés aromatiques qui seraient présents dans les fractions 1S et 1I, 3S et 4I..

Ces tests nous donnent ainsi des indications sur le choix du système de solvants pour optimiser l'extraction de partage centrifuge mais il est tout de même à prendre en considération que ce ne sont pas

exclusivement les composés phénoliques qui ont été détectés. La première solution semble être la plus intéressante pour démarrer : un mélange acétate d'éthyle:eau (1:1).

2.2.3.2 Analyse des fractions sélectionnées

- Chromatogrammes

Deux longueurs d'onde avaient été testées pour la CPC1, le chromatogramme présentant des pics intéressants a été obtenu à 254 nm tandis que celui obtenu à 190 nm n'est pas exploitable. Pour la CPC2, 3 longueurs d'onde avaient été testées : le chromatogramme obtenu n'était pas exploitable à 240 nm et les deux chromatogrammes obtenus à 270 et 280 nm ont été identiques, nous avons donc sélectionné uniquement celui à 280 nm. Des volumes de collecte différents avaient été appliqués pour les 2 essais de CPC : un nombre de 90 fractions de 9 mL chacune a été obtenu pour la CPC1 et 32 fractions de 25 mL pour la CPC2. Comme le nombre de fractions obtenues est très important, nous avons sélectionné les fractions suivantes en fonction des absorbances mesurées sur les chromatogrammes obtenus à 254 nm pour la CPC1 et à 280 nm pour la CPC2 (Figure 2-14) : 21, 23, 41, 43, 48, 49, 66 et 67 pour la CPC1 et 1, 6, 7, 29 et 30 pour la CPC2.

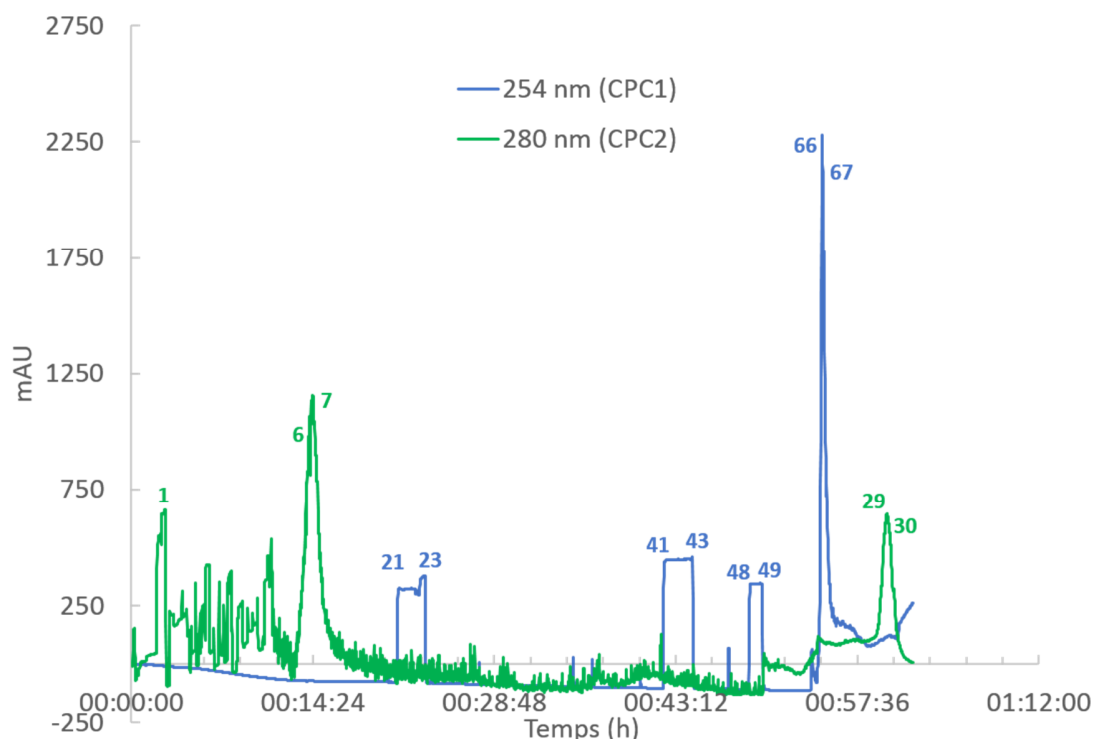


Figure 2-14 : Chromatogrammes obtenus à une longueur d'onde de 254 nm pour la CPC1 (en bleu) et à 280 nm pour la CPC2 (en vert) à partir d'un extrait ASE d'*Halidrys siliquosa*. Les numéros correspondent aux fractions retenues pour les analyses suivantes.

Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale

Toutes ces fractions sont biphasiques, avec l'acétate d'éthyle en partie supérieure et l'eau en partie inférieure.

- Détection des composés phénoliques

Dans un premier temps, les fractions sélectionnées ont été analysées par ^1H RMN afin d'observer ou non la présence des composés phénoliques (Figure 2-15).

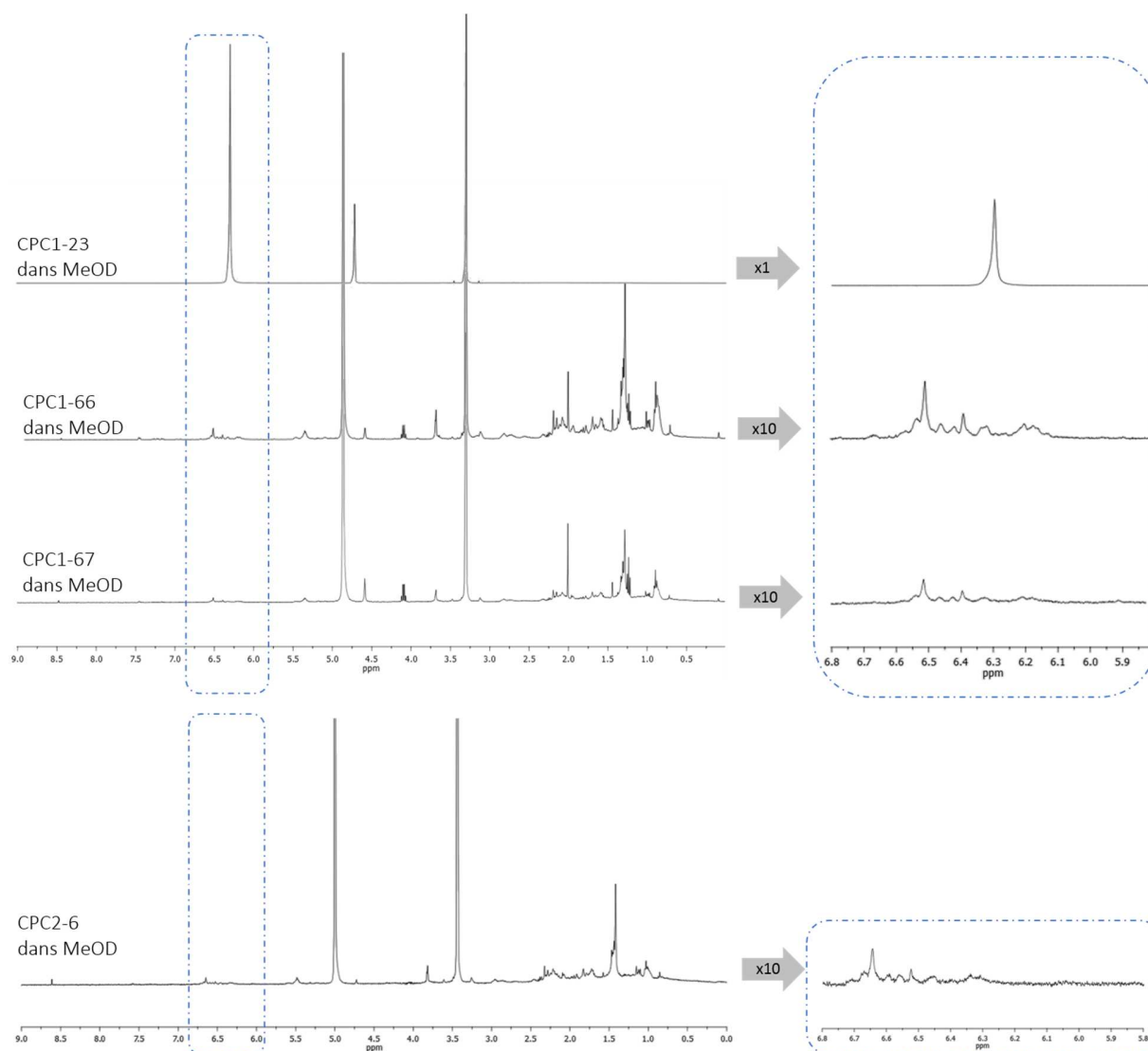


Figure 2-15 : Spectres ^1H RMN des fractions présentant des composés phénoliques, obtenues par deux Chromatographies de Partage Centrifuge à parti d'un extrait ASE d'*Halidrys siliquosa*: CPC1 (collecte de fractions tous les 9 mL et suivi de la DO à des longueurs d'onde de 190 et 254 nm) ou CPC2 (collecte de fractions tous les 25 mL et suivi de la DO à des longueurs d'onde de 240, 270 et 280 nm). Les fractions diluées dans le méthanol deutéré (MeOD) correspondent aux phases supérieures (qui étaient dans l'acétate d'éthyle). Afin, de mieux observer la zone des composés aromatiques, un zoom (à droite) a été effectué.

Pour les fractions CPC1, des signaux dans la zone des aromatiques ont été observés pour trois fractions, 23, 66 et 67 avec un singulet pour la fraction 23 et plusieurs pics pour les fractions 66 et 67. Concernant les fractions CPC2, des signaux de composés aromatiques, identiques à ceux obtenus pour la fraction 66, sont obtenus seulement dans la fraction 6 (Figure 2-15).

Les composés phénoliques ont été quantifiés grâce au test du Folin-Ciocalteu dont les résultats sont présentés dans la Figure 2-16, pour les fractions qui ont montré des teneurs en CP. Des teneurs en CP de l'ordre de 100 mg.g⁻¹ d'extrait pour les fractions 66 et 67 de la CPC1 ont en adéquation avec la présence de ces composés observés en RMN (Figures 2-15, 16). Les teneurs en composés phénoliques entre ces deux fractions ne sont pas différentes statistiquement (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,999$) (Figure 2-16). Quatre fractions de la CPC2 ont montré des teneurs en CP : les fractions 6S et 7S (obtenues dans l'acétate d'éthyle) et les fractions 29I et 30I (obtenues dans l'eau). Aucune différence significative entre les fractions 6S et 7S a été mise en évidence et aussi entre les fractions 29I et 30I (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,991$ et $p = 0,962$ respectivement). Les teneurs en CP des phases supérieures de 29 et 30 n'ont pas pu être quantifiées car les volumes obtenus étaient trop faibles. Cependant, les fractions 29I et 30I ont montré des teneurs en CP significativement inférieures aux fractions 6S et 7S (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

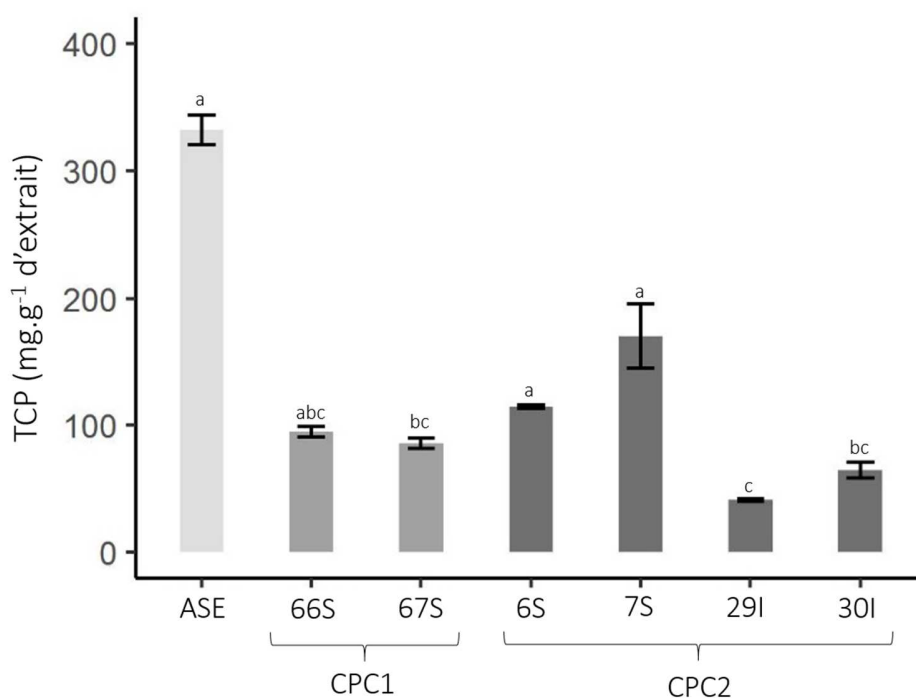


Figure 2-16 : Teneurs en composés phénoliques (TCP, mg.g⁻¹ d'extrait) de certaines fractions de Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC1 ou CPC2) à partir d'un extrait brut (ASE 300) d'*Halidrys siliquosa*. S = phase supérieure ; I = phase inférieure. Les lettres indiquent une différence significative entre les différentes fractions (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$, $n=3$).

Ces teneurs des fractions 6 et 7 (114,2 et 170,0 mg. g⁻¹ d'extrait respectivement) sont néanmoins plus faibles que l'extrait brut ASE (332,1 mg.g⁻¹ d'extrait) mais pas différentes significativement (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,681$ et $p = 0,981$ respectivement).

- Activités antioxydantes

Concernant les deux fractions de la CPC1 (66 et 67), l'activité anti-radicalaire comparativement à l'extrait brut (ASE) est moins intéressante comme le montre les IC50 : 0,334, 0,348 et 0,089 mg.mL⁻¹ respectivement (Figure 2-17). De plus, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre ces échantillons (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,880$ entre 66S et ASE, $p = 0,636$ entre 67S et ASE). Cependant ces fractions sont éloignées des activités des témoins positifs, BHA, vitamines C et E (0,041, 0,054 et 0,090 mg.mL⁻¹ respectivement). Concernant les fractions de la CPC2, les fractions 6 et 7 ont présenté des activités anti-radicalaires similaires à elles obtenues avec la CPC1 (66 et 67) : 0,298 et 0,272 mg.mL⁻¹ respectivement. Les fractions 29 et 30 de la CPC2 montrent des activités anti-radicalaires moins importantes que les fractions 6 et 7 avec des IC50 au-delà de 1,4 mg.mL⁻¹.

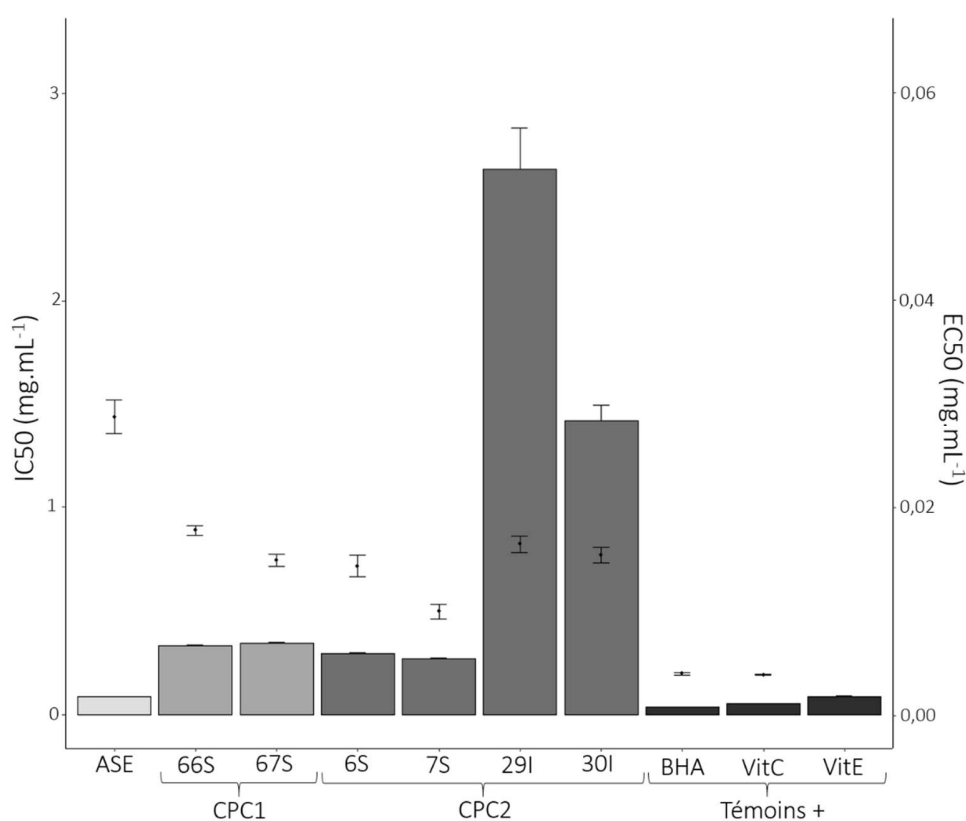


Figure 2-17 : Activités antiradicalaires (DPPH ; IC50 ; mg.mL⁻¹ ; histogramme) et réductrices (FRAP ; EC50 ; mg.mL⁻¹ ; point) de certaines fractions obtenues par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC1 ou CPC2) à partir d'un extrait brut (ASE) d'*Halidrys siliquosa*. Résultats statistiques en données supplémentaires (cf. page 158).

Les résultats de l'activité réductrice déterminée par le test du FRAP suivent une autre tendance entre l'extrait brut et les fractions purifiées. En effet, les fractions 66 et 67 de la CPC1 ont montré des EC50 plus faibles que l'extrait brut ASE (0,018, 0,015 et 0,029 mg.mL⁻¹ respectivement). Cependant, leur activité n'est pas similaire aux témoins positifs, BHA et vitamine C : 0,004 mg.mL⁻¹. Comme pour l'activité antiradicalaire, l'activité réductrice des fractions 6 et 7 de la CPC2 est similaire aux fractions 66 et 67 de la CPC1 : 0,014 et 0,010 mg.mL⁻¹ (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p > 0,05$). L'activité réductrice est plus intéressante que l'activité anti-radicalaire pour les fractions 29 et 30 de la CPC1, avec des EC50 proches des autres fractions CPC1 et CPC2 : 0,016 et 0,015 mg.mL⁻¹. Les activités réductrices de ces différentes fractions obtenues par CPC sont toutefois plus faibles que les témoins positifs.

2.2.4 Comparaison des méthodes d'extraction et de purification des composés phénoliques

La **Figure 2-18** permet d'avoir un aperçu global de la teneur en composés phénoliques et des activités antioxydantes obtenues par les différentes méthodes d'extraction et de purification testées sur *Halidrys siliquosa*.

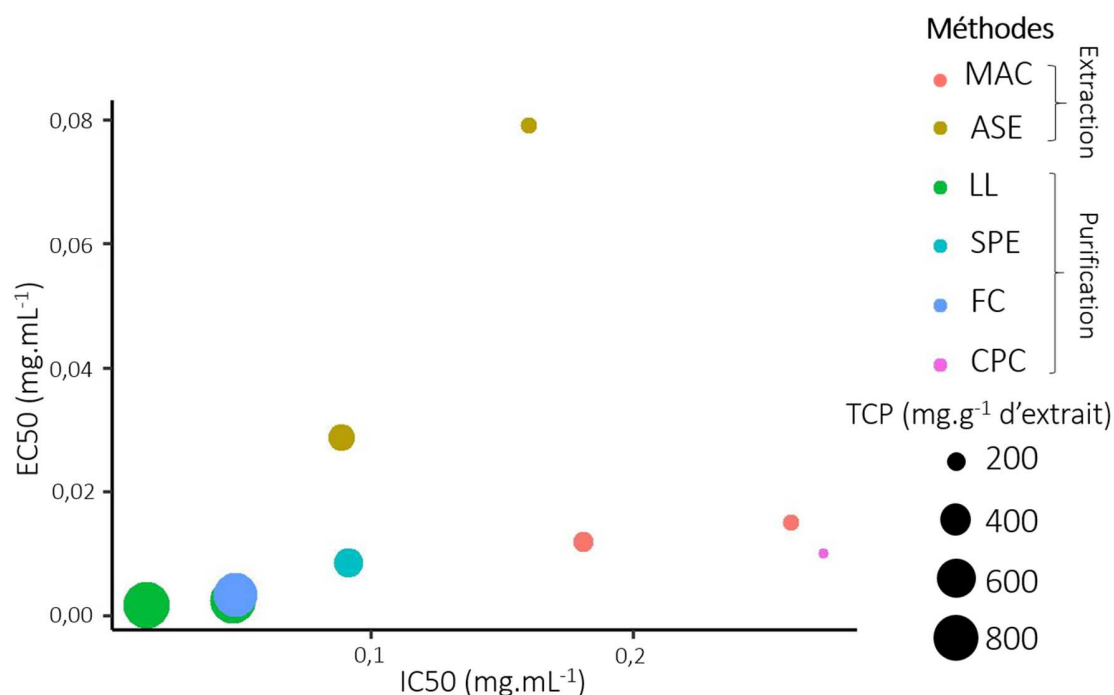


Figure 2-18 : Comparaison des activités antioxydantes - anti-radicalaire (IC50 ; mg.mL⁻¹) et réductrice (EC50 ; mg.mL⁻¹) - et de la teneur en composés phénoliques (TCP ; mg.g⁻¹ d'extrait) obtenues après différentes méthodes d'extraction et de purification effectuées sur *Halidrys siliquosa* : MAC = macération, ASE = extraction accélérée par solvant, LL = purification liquide/liquide, SPE = extraction en phase solide, FC = flash-chromatographie, CPC = chromatographie de partage centrifuge. Les deux points ASE correspondent aux extractions avec l'ASE 150 (sur *Halidrys siliquosa* récoltée en 2016) et l'ASE 300 (sur *Halidrys siliquosa* récoltée en 2017). Les deux points MAC et LL correspondent à la macération et à la purification LL réalisée sur *Halidrys siliquosa* récoltée en 2016 et en 2017.

Concernant les méthodes d'extraction, l'ASE est comparable en termes de TCP à la macération mais pas en termes d'activités antioxydantes. La macération a montré une activité réductrice plus intéressante que l'ASE alors que l'ASE a montré une activité anti-radicalaire plus intéressante que la macération. De manière générale, les méthodes de purification ont permis de concentrer les composés phénoliques et leurs activités, exceptées pour la CPC. La méthode de purification LL a révélé le plus fort enrichissement en composés phénoliques et une augmentation des activités antioxydantes. La FC a également affiché des TCP et des activités antioxydantes très proches de la méthode de purification classique, la SPE les suivant de prêt.

La productivité de ces différentes méthodes a également été calculée (Tableau 2-3). Les résultats des macérations et des purifications LL effectuées sur deux lots d'*H. siliquosa* (2016 et 2017) ont été poolés. Dans un premier temps, si l'on compare les deux méthodes d'extraction, la méthode alternative, ASE, a montré une meilleure productivité que la méthode classique qui est la macération, et cela, quelque soit le type d'équipement (ASE 150 / ASE 300) utilisé. Ensuite, si l'on compare les méthodes de purification, les méthodes alternatives SPE et FC ont présenté une productivité plus forte que la méthode classique, alors que la CPC montre une productivité inférieure à la purification liquide/liquide (LL).

Tableau 2-3 : Productivité (mg de CP.g⁻¹.min⁻¹.L⁻¹) calculée pour chaque méthode d'extraction et de purification selon l'équation de Tanniou et al. (2013). Les résultats des macérations et des purifications LL effectuées sur deux lots d'*H. siliquosa* (2016 et 2017) ont été poolés.

Méthodes	Type de méthodes	Productivité (mg de CP.g ⁻¹ .min ⁻¹ .L ⁻¹)
Extraction	MAC	3,82 ± 0,46
	ASE 150 (LEMAR)	306,56
	ASE 300 (Biodimar)	442,81
Purification	LL	3,44 ± 0,09
	SPE	12,77
	FC	32,92
	CPC	2,25

2.2.5 Discussion

Les résultats obtenus pour la recherche des paramètres d'ASE ainsi que la semi-purification par SPE ont été discutés dans le paragraphe présentant la publication à soumettre. J'ai donc ci-dessous discuté des résultats obtenus pour la Flash-Chromatographie (FC) et pour la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC). Enfin, j'ai discuté des résultats de comparaison des teneurs en CP et des activités biologiques obtenues selon les méthodes d'extraction et de purification.

2.2.5.1 Intérêt de la Flash-Chromatographie (FC)

Grâce à la méthode de purification Flash-Chromatographie, il est possible de concentrer les composés phénoliques. Dans notre étude, nous avons réussi à multiplier par 2,5 la teneur en composés phénoliques entre l'extrait brut obtenu par ASE et la fraction purifiée par FC à l'éthanol 20%. De telles performances ont également été obtenues par Tierney et al. (2013c), qui ont également réussi à concentrer les composés phénoliques grâce à la FC en phase inverse, comme dans notre étude. Après des macérations à l'éthanol ou à l'eau suivie d'une ultrafiltration, ces auteurs ont effectué une FC sur le dialysat inférieur à 3,5 kDa à partir de 3 algues brunes appartenant aux Fucales, *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata* et *Fucus spiralis*. Tierney et al. (2013c) ont ainsi concentré la teneur en composés phénoliques jusqu'à plus de 16 fois pour *A. nodosum*, 5 pour *P. canaliculata* et 10 pour *F. spiralis* dans la fraction FC méthanolique obtenue sur l'extrait éthanolique. Ils ont également montré une corrélation entre la teneur en CP et les activités antioxydantes pour les fractions obtenues par FC, et notamment avec le test du DPPH ($r = 0,895$, $p < 0,05$) mais aussi le test du FRAP ($r = 0,890$, $p < 0,05$). De la même manière, Heffernan et al. (2015a) ont concentré les composés phénoliques par 6 et plus de 3 pour les fractions FC méthanoliques réalisées sur les dialysats inférieurs à 3,5 kDa et obtenus avec respectivement les extraits aqueux et éthanoliques de *Fucus serratus*. L'enrichissement en composés phénoliques obtenus dans ces deux précédentes études est donc bien plus élevé comparativement à celle-ci ; cependant ils ont effectué une étape d'ultrafiltration en amont amenant à des coûts élevés pour une industrialisation potentielle. De plus, ils ont utilisé du méthanol comme solvant d'élution pour la FC qui est un solvant toxique ne respectant pas le règlement REACH, et ne correspondant pas aux critères listés pour une extraction éco-responsable. D'autre part, nous avons montré tout comme Heffernan et al. (2015a), que la FC permet également d'éliminer de la fraction finale les molécules hautement polaires comme les sucres (dont le mannitol) mais aussi les molécules lipidiques.

2.2.5.2 Intérêt de la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

Dans notre étude, nous n'avons pas réussi à concentrer les CP grâce à la technique de CPC. En effet, la teneur en CP de l'extrait brut obtenu par ASE était supérieure à la teneur des fractions obtenues par CPC. Pour tenter d'améliorer cette méthode, il serait intéressant de tester d'autres paramètres. Selon Lee et al. (2014b), le coefficient de partage (Kd) dans un système biphasique de solvants appropriés est la variable la plus importante pour une séparation réussie des molécules cibles. Il serait peut-être intéressant de tester le deuxième système de solvants avec lequel la séparation semblait équilibrée entre les deux phases : le mélange *n*-hexane:acétate d'éthyle:éthanol:eau milliQ (1:8:2:7 ; v:v). Ce système de solvants se rapproche beaucoup de celui utilisé par Lee et al. (2014b) et Kim et al. (2016) pour concentrer les

phlorotannins d'*Ecklonia cava* et *Ishige okamurae* respectivement, sauf qu'ils ont utilisé le méthanol à la place de l'éthanol. Nous avons d'ailleurs expérimenté ce mélange (n°2) avec le méthanol mais celui-ci permettait une moins bonne séparation équilibrée entre les deux phases par rapport au mélange avec l'éthanol ou avec l'acétate d'éthyle. Peu d'études ont été menées sur la purification des phlorotannins par CPC. Cette technique peut être utilisée comme technique d'extraction, de semi-purification voire de purification. [Tanniou et al. \(2013\)](#) ont utilisé la CPC comme une méthode d'extraction. Ces auteurs ont utilisé le même système de solvant que dans notre étude (acétate d'éthyle:eau, 1:1, v:v) mais en mode d'élution descendant avec la phase organique comme phase stationnaire et la phase aqueuse comme phase mobile à l'inverse de notre étude (mode ascendant). Leur extraction a duré pendant 3 min à 800 rpm et un débit de 75 mL.min⁻¹. C'est donc une méthode beaucoup plus rapide et sous plus forte pression que notre étude. Dans leur étude, [Tanniou et al. \(2013\)](#) ont comparé la CPC à l'extraction solide/liquide avec le même système de solvant. Ils ont ainsi montré une plus forte teneur en CP obtenue par la CPC (environ 22%) en comparaison de l'extraction solide/liquide (environ 18%). Cette méthode est également utilisée comme méthode de purification afin d'isoler les phlorotannins à un degré de pureté très élevé comme l'a montré [Lee et al. \(2014b\)](#) et [Kim et al. \(2016\)](#). Dans l'étude de [Lee et al. \(2014b\)](#), ce sont les phlorotannins, d'une fraction acétate d'éthyle de la Laminariales *Ecklonia cava* enrichie en composés phénoliques, qui ont été isolés par CPC avec le système biphasique de solvants *n*-hexane:acétate d'éthyle:méthanol:eau (2:7:3:7, v/v). La phase supérieure organique a été utilisée comme phase stationnaire et la phase inférieure aqueuse a été utilisée comme phase mobile (mode d'élution descendant) à l'inverse de notre étude (mode ascendant). Après analyse par HPLC des fractions, les auteurs ont isolé des phlorotannins différents selon les fractions avec des rendements intéressants à partir de la fraction initiale enrichie en CP de 500 mg : le dieckol présent dans la fraction 1 (40,2 mg), le phlorofucofuroeckol présent dans la fraction 3 (31,1 mg) ainsi que le 2,7-phloroglucinol-6,6-bieckol et le pyrogallol-phloroglucinol-6,6-bieckol présents dans la fraction 2 (34,1 mg). Les deux premiers phlorotannins ont été obtenus à plus de 90 % de pureté. Ces phlorotannins étaient déjà identifiés dans la fraction semi-purifiée à l'acétate d'éthyle mais ils ont pu être séparés et isolés grâce à la CPC. De la même manière, [Kim et al. \(2016\)](#) ont réussi à obtenir des fractions purifiées à partir d'une fraction acétate d'éthyle de l'Ishigeales *Ishige okamurae* grâce à la CPC en obtenant le diphlorethohydroxycarmalol (DPHC) (39 mg sur 500 mg) dans une première fraction et l'octaphlorethol (23 mg sur 500 mg) dans une deuxième fraction. Dans leur étude, ils ont utilisé le même système de solvant que [Lee et al. \(2014b\)](#) mais à des proportions différentes (0,5:10:4:6, v:v). De plus, ils ont effectué un mode d'élution ascendant avec comme phase stationnaire la phase inférieure aqueuse et comme phase mobile la phase supérieure organique, comme dans notre étude.

Cette méthode CPC mérite d'être approfondie en optimisant davantage les paramètres puisqu'elle possède divers avantages pour les industriels : elle permet un temps d'extraction court, des rendements élevés ainsi que la réduction de coûts opérateurs. Concernant ces paramètres, il serait notamment intéressant de tester l'incorporation de l'extrait d'algues dissout dans le système de solvant comme [Lee et al. \(2014b\)](#) et [Kim et al. \(2016\)](#) et non seulement dans l'eau comme nous avons fait dans notre étude.

2.2.5.3 Comparaison méthodes alternatives versus méthodes traditionnelles

Lors de cette étude, nous avons pu comparer des méthodes d'extraction et de purification classiques avec des méthodes alternatives. Concernant les méthodes d'extraction, l'ASE a permis d'obtenir une teneur en CP équivalente voir supérieure à la macération classique. [Tanniou et al. \(2013\)](#) ont comparé la teneur en CP d'extraits de *Sargassum muticum* obtenus par la méthode d'extraction classique (extraction solide/liquide) et par les méthodes alternatives (ASE, CPC, extraction de fluide supercritique (EFS)) : elle était 5 % plus importante en poids sec par la méthode traditionnelle. Dans leur étude, ces auteurs ont montré que les spectres RMN du proton et HRMAS ne présentaient aucun signal dans la zone des composés aromatiques pour l'extrait EFS tandis que les signaux de CP étaient majoritairement retrouvés pour l'extrait ASE. Cependant, l'activité anti-radicalaire, tout comme la TCP, a été plus importante pour la méthode d'extraction solide/liquide comparativement aux méthodes alternatives.

Concernant les méthodes de purification, les résultats de notre étude ont montré que la purification LL permet de concentrer entre 4 et 5 fois les composés phénoliques d'un extrait obtenu par macération, la FC 2,5 fois et la SPE 2 fois d'un extrait obtenu par ASE, tandis que la CPC n'a pas permis l'enrichissement en composés phénoliques.

D'autre part, nous avons pu comparer nos différentes méthodes grâce au calcul de leur productivité basé sur la teneur en composés phénoliques, le temps d'extraction et la quantité de solvant utilisé. Nous avons notamment montré une productivité très élevée pour l'ASE, tout comme l'ont montré [Tanniou et al. \(2013\)](#). Ces derniers ont obtenu une productivité de 200,13 mg de CP.g⁻¹.min⁻¹.L⁻¹ tandis que nous avons obtenu une productivité entre 306,56 et 442,81 mg de CP.g⁻¹.min⁻¹.L⁻¹ selon le type d'ASE utilisé. Ils ont également montré que les méthodes alternatives sont plus efficaces que les méthodes traditionnelles avec la meilleure productivité pour l'ASE (200,13) suivie par la CPC (4,22), la macération (entre 1,53 et 1,79 selon le pourcentage d'éthanol) et l'EFS (0,74). De la même manière, nous avons obtenu une productivité plus élevée pour les méthodes alternatives (FC et SPE) comparativement à la méthode traditionnelle (LL), sauf pour la CPC qui a une productivité quasiment similaire à la méthode LL.

2.2.6 Conclusion

Les industriels sont à la recherche de nouvelles technologies d'extraction et de purification de molécules alternatives dites éco-responsables et également à l'écoute du consommateur qui recherche de plus en plus de produits naturels ayant le moins d'impact sur l'environnement. Dans cette étude, nous avons exploré différentes méthodes d'extraction et de purification, classique versus alternative : l'extraction solide/liquide (MAC) versus l'Extraction Accélérée par Solvant (ASE) ; la purification liquide/liquide (LL) versus la Flash-Chromatographie (FC), l'Extraction en Phase Solide (SPE) ou la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC). Concernant la FC, la fraction obtenue avec de l'éthanol:eau 20:80 (v:v) a permis d'obtenir une fraction 2,5 fois plus enrichie en composés phénoliques actifs que l'extrait brut (ASE). A l'inverse, les résultats concernant la Chromatographie de Partage Centrifuge n'ont pas montré d'enrichissement en composés phénoliques par rapport à l'extrait brut. Cependant, les paramètres n'ont pas été optimisés et de nombreux paramètres peuvent être modifiés tels que le système de solvants, le débit, la vitesse de rotation ou encore le temps d'extraction. Lorsque l'on compare les différentes méthodes entre elles, la FC semble être la méthode alternative se rapprochant le plus de la méthode classique de purification liquide/liquide permettant un enrichissement très important en composés phénoliques. Quand une méthode efficace d'extraction et de purification est enfin trouvée, il s'agit ensuite d'identifier les différents types de phlorotannins obtenus dans ces fractions enrichies selon les méthodes d'extraction et de purification mais aussi selon les espèces d'algues.

2.2.7 Données supplémentaires

Résultats statistiques des activités anti-oxydantes des fractions CPC

Tableau : *P* obtenues par des tests statistiques (test post-hoc PMCMR après un test Kruskal-Wallis) appliqués aux fractions CPC pour (A) l'activité anti-radicalaire mesurée par le test du DPPH et (B) l'activité antioxydante par le test FRAP. Les valeurs significatives ($p < 0.05$) sont en gras.

A

	29I	30I	66S	67S	6S	7S	ASE	BHA	VitC
30I	1,000								
60S	0,964	0,998							
67S	0,998	1,000	1,000						
6S	0,813	0,964	1,000	0,998					
7S	0,537	0,813	0,998	0,964	1,000				
ASE	0,142	0,347	0,880	0,636	0,984	1,000			
BHA	0,007	0,029	0,266	0,100	0,537	0,813	0,994		
VitC	0,029	0,100	0,537	0,266	0,813	0,964	1,000	1,000	
VitA	0,198	0,439	0,930	0,730	0,994	1,000	1,000	0,984	1,000

Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale

B

	29I	30I	66S	67S	6S	7S	ASE	BHA
30I	1,000							
60S	1,000	0,974						
67S	0,986	1,000	0,860					
6S	0,980	1,000	0,835	1,000				
7S	0,665	0,999	0,333	0,996	0,998			
ASE	0,990	0,822	1,000	0,575	0,539	0,122		
BHA	0,318	0,732	0,107	0,920	0,936	1,000	0,028	
VitC	0,148	0,485	0,038	0,748	0,779	0,994	0,008	1,000

3 Méthodes d'identification des composés phénoliques

Grâce au test colorimétrique du Folin-Ciocalteu et l'analyse par ^1H RMN, nous avons confirmé que des composés phénoliques sont présents dans les différents extraits et fractions obtenus précédemment dans cette thèse. Cependant, ces deux méthodes donnent une simple information de la quantité de composés aromatiques et une indication sur la présence du type de composés phénoliques selon les profils obtenus par ^1H RMN, en particulier lorsque qu'une RMN à deux dimensions est menée (Stiger-Pouvreau et al., 2014). Pour pouvoir identifier les molécules d'intérêt isolées dans ce travail de thèse, il faut des fractions enrichies en métabolites d'intérêt et donc purifiées. Différentes méthodes peuvent être utilisées comme celles présentées dans la partie 3 de ce Chapitre 2 et notamment la purification liquide/liquide et la Flash-Chromatographie. L'ultrafiltration est également une méthode utilisée pour obtenir des fractions avec un poids moléculaire précis. Pour identifier ces molécules, des méthodes d'identification existent comme la RMN à deux dimensions, qui associe la RMN du carbone à la ^1H RMN, la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier ou encore la spectrométrie de masse. Couplée à la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) qui permet de séparer les composés phénoliques d'un extrait enrichi, ces méthodes de détection permettent d'identifier et de quantifier ces CP (Ferrerres et al., 2012 ; Steevensz et al., 2012 ; Goiris et al., 2014 ; Karthik et al., 2016 ; Le Lann et al., 2016 ; Rajauria et al., 2016 ; Agregán et al., 2017b ; Rajauria, 2018). Cependant, pour les phlorotannins, leur caractérisation structurale et leur identification sont difficiles du fait de leur complexité, leur nature polymérique, leurs potentielles instabilité et oxydation rapide ainsi que leur capacité à se complexer avec d'autres molécules (Stiger-Pouvreau et al., 2014). De plus, il n'existe pas de standards de phlorotannins avec des degrés de polymérisation différents (les phlorotannins étant des polymères du phloroglucinol). Dans cette partie, une mise au point de méthodes d'identification des phlorotannins par HPLC et aussi par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF a été initiée.

La chromatographie liquide à haute pression (HPLC) est une technique de séparation analytique (Figure 2-19). L'échantillon à analyser passe avec la phase mobile dans une colonne remplie d'une phase stationnaire. Le système est sous pression, avec un débit d'écoulement de la phase mobile permettant de séparer les composés le long de la phase stationnaire. Ces molécules à la sortie de la colonne sont détectées par différents détecteurs : détecteurs spectroscopiques comme la spectroscopie d'absorption (détecteur à barrette de diode, DAD) ou la spectroscopie de fluorescence (fluorimètre, FLD), détecteurs électrochimiques, détecteurs évaporatifs à diffusion de lumière (ELSD) ou encore la spectrométrie de masse. Nous avons à disposition 3 détecteurs. Le premier est le DAD (détecteur à barrettes de diode) dont le principe est basé sur l'absorption des molécules par la lumière (λ choisies entre 200 et 400 nm).

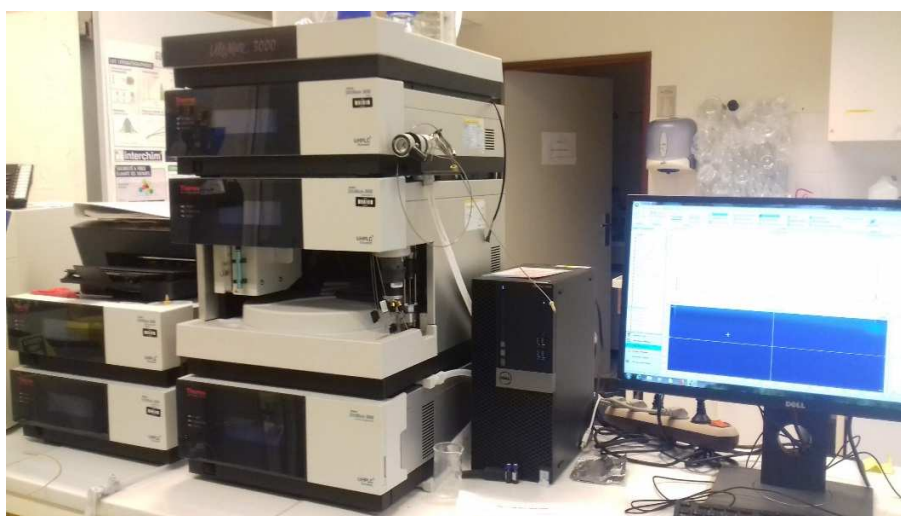


Figure 2-19 : Photographie de la chaîne HPLC avec le détecteur DAD sur la gauche.

Le deuxième est le FLD dont le principe est basé sur le rayonnement émis par une radiation lumineuse qui excite certaines molécules à une longueur d'onde donnée, ce qui entraîne une émission de lumière par ces molécules excitées en retournant à leur état normal. Enfin, le troisième est l'ELSD dont le principe est basé sur la nébulisation de l'échantillon créant ainsi des microgouttelettes projetées dans une cellule qui inclut une source lumineuse : les particules éclairées dévient la lumière en fonction de leur taille, ainsi l'intensité de la lumière dispersée par les particules est liée à la quantité de composé élué. Dans les résultats, sont présentés uniquement les résultats obtenus avec le DAD, puisque les deux autres détecteurs n'ont pas permis une meilleure détection des phlorotannins. Ceux-ci sont présentés sous forme de chromatogramme.

L'HPLC-DAD seule n'est cependant pas suffisante pour identifier avec certitude les composés. Une molécule peut se retrouver au même temps de rétention, et pour les différencier le poids moléculaire est un critère déterminant. Des méthodes déterminant le poids moléculaire des métabolites permettent d'identifier les composés, c'est le cas des spectromètres de masse. Le MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight) est un spectromètre de masse qui n'est pas couplée à une méthode séparative contrairement aux autres technologies utilisées en spectrométrie de masse. C'est une technique d'ionisation douce qui cible les molécules préalablement purifiées. Le MALDI-TOF est un spectromètre de masse pouvant être séparé en 4 parties et 4 étapes distinctes : (1) le système d'introduction de l'échantillon sur une cible (Figure 2-20) où se trouve l'échantillon dispersé dans une quantité de matrice, (2) la chambre d'ionisation où est irradié l'échantillon par des photons émis par un laser dont la longueur d'onde est située dans la bande d'absorption de la matrice, provoquant une grande quantité d'énergie et produisant des ions en phase gazeuse, (3) l'analyseur à temps de vol (TOF) séparant

Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale

les ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) et (4) le détecteur transformant le courant ionique en courant électrique qui est, dans notre étude, un TOF, d'où la dénomination de MALDI-TOF/TOF. Le rôle de la matrice est de favoriser la séparation des molécules, absorber l'énergie du faisceau laser et favoriser l'ionisation des molécules. L'utilisation d'un MALDI-TOF/TOF est intéressante puisqu'elle permet l'identification de molécules à des poids moléculaires au-delà d'autres spectromètres tels que l'ESI (ionisation par électronébulisateur) à plus de 2000 Da. Le résultat obtenu est un spectre de masse avec l'intensité (au) en fonction du rapport masse sur charge (m/z), correspondant à une sorte d'empreinte digitale spécifique et unique de l'échantillon.



Figure 2-20 : Photographie de la plaque appelée cible (à gauche) ainsi que le spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF de la plateforme de Spectrométrie de Masse de l'UBO (Autoflex III, Bruker, Etats-Unis) (à droite).

3.1 Matériels et Méthodes

3.1.1 Standards

Les seuls standards disponibles pour analyser les phlorotannins en chromatographie sont le phloroglucinol, monomère structurant des phlorotannins, ainsi qu'une molécule analogue au phloroglucinol, le pyrogallol. La [Figure 2-21](#) présente la structure de ces deux standards. Nous avons également utilisé l'acide gallique qui est un acide phénolique que l'on retrouve dans les algues rouges et vertes ([Figure 2-21](#)). Des solutions de ces 3 standards ont été préparées à 1 mg.mL^{-1} avec de l'eau milliQ puis filtrées à l'aide d'un filtre seringue présentant des pores de $0,2 \mu\text{m}$ (FisherBrand™, Fisher Scientific™, Etats-Unis). Pour établir les gammes étalons, nous avons utilisé différentes concentrations de phloroglucinol et de pyrogallol en fonction de l'aire sous la courbe du pic correspondant à la molécule, exprimée en $\text{mAU} \cdot \text{min}$.



Figure 2-21 : Structure de composés phénoliques : phloroglucinol, pyrogallol et acide gallique.

3.1.2 Matériel végétal

Deux algues brunes ont été étudiées lors de cette expérience : *Halidrys siliquosa* et *Fucus serratus* récoltées et séchées par l'entreprise C-Weed Aquaculture en janvier 2016 ou 2017 et juillet 2017 respectivement.

3.1.3 Extraction et purification

3.1.3.1 Macération suivie de la purification liquide/liquide

Ces extraction/purification ont été menées sur *Halidrys siliquosa* récoltée en avril 2016. L'étape d'extraction consistait en une macération à l'éthanol/eau suivi de l'étape de purification liquide/liquide permettant d'obtenir une fraction enrichie en composés phénoliques. Toutes les étapes des méthodes sont détaillées dans la première partie de Chapitre (cf. pages 101 et 104).

3.1.3.2 Extraction accélérée par Solvant (ASE) suivie par la Flash-Chromatographie (FC)

Ces extractions et purifications ont été menées sur *Halidrys siliquosa* (janvier 2017) : une extraction accélérée par solvant (ASE 300 de la plateforme Biodimar) a d'abord été menée suivie d'une étape de purification par Flash Chromatographie. Toutes les étapes sont détaillées dans la première partie de ce Chapitre (cf. pages 106-107).

3.1.3.3 Macération suivie de l'ultrafiltration

Ces extraction/purification ont été menées sur *Halidrys siliquosa* (janvier 2017) et *Fucus serratus* (juillet 2017). Les résultats de *F. serratus* et ceux d'*H. siliquosa* seront présentés.

- Macération

Le protocole utilisé est celui publié par Kirke et al. (2017). Pour cela, 30 g d'algues ont été mélangés à 300 mL d'un mélange de méthanol:eau (80:20, v:v) (Figure 2-22). L'extraction solide/liquide a été réalisée à température ambiante pendant 24 h à l'abri de la lumière et sous agitation à 200 rpm (Julabo GmbH SW22, Allemagne). Le solvant a été renouvelé trois fois, en filtrant sur coton de verre l'extrait liquide et en reprenant le culot dans un même volume de 300 mL. Ensuite, les 1200 mL ainsi obtenus ont été évaporés par évaporateur rotatif (Laborota 4000 efficient Heidolph, Allemagne).

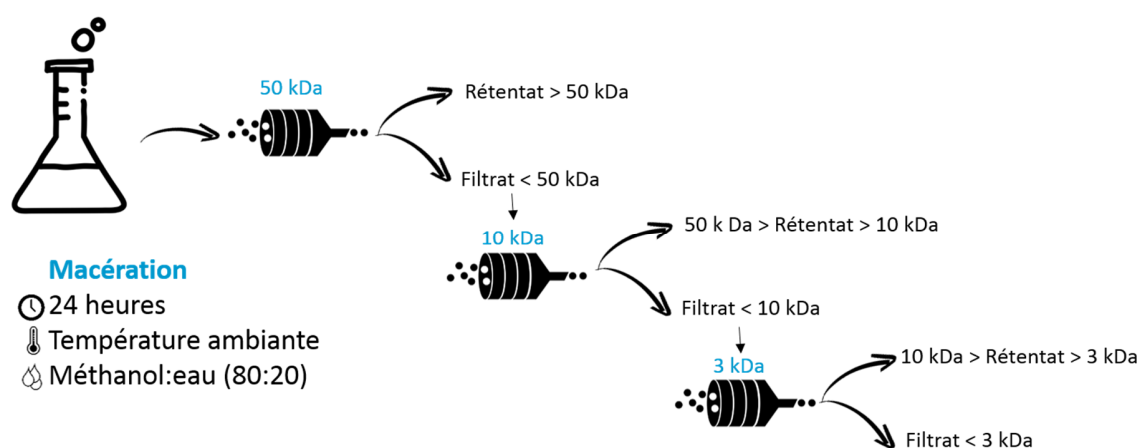


Figure 2-22 : Protocole de la méthode de macération suivie de l'ultrafiltration.

- Ultrafiltration

L'ultrafiltration tangentielle consiste à passer un extrait brut à travers des membranes poreuses ayant différents seuils de poids moléculaire. Les phlorotannins ont des poids moléculaires situés entre 126 Da et 650 kDa, nous avons donc utilisé différents seuils de coupure, 50, 10 et enfin 3 kDa. Le protocole utilisé a été adapté de Prodanov et al. (2008) et Ar Gall et al. (2015). Avant utilisation, le système et les membranes (Minimate™ TFF System, PALL, Etats-Unis) ont été lavés à l'eau distillée pour enlever la solution de conservation jusqu'à ce que le pH du filtrat et du retentat soit de 5,5. Le débit de la pompe était de 30 mL.min⁻¹ afin de ne pas dépasser une pression de 2 bar. Des quantités de 101,0 mg et 101,9 mg des extraits bruts de *Fucus serratus* et *Halidrys siliquosa* ont été diluées dans un volume de 200 mL et déposées dans l'appareil d'ultrafiltration. Un premier passage a été réalisé avec la première membrane d'ultrafiltration ayant un seuil de coupure de 50 kDa (Figure 2-22). Après avoir lancé le système, un volume

d'environ 50 mL de filtrat a été obtenu à l'obscurité. Ensuite, une partie de ce filtrat a été mis de côté pour des analyses ultérieures, et l'autre partie a été relancée sur une nouvelle membrane cette fois-ci à un seuil de coupure de 10 kDa. Le même protocole a été suivi pour les membranes suivantes, 10 kDa et 3 kDa. Tous les rétentats et filtrats ont été évaporés, repris dans de l'eau, congelés et lyophilisés.

3.1.4 Analyse des rétentats et filtrats par HPLC

L'appareil utilisé a été l'HPLC ThermoFisher U3000 (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis). Nous avons choisi une colonne Waters XSelect HSS PFP (2,5 μm , 3 mm X 150 mm ; Etats-Unis), colonne HPLC à base de silice dites non « en-capped » (c'est-à-dire avec des fonctions hydroxyles libres ou groupements Si-OH) conçue pour les séparations à faible pH qui nécessitent une sélectivité alternative par rapport à la phase C_{18} entièrement « end-capped (sans fonctions hydroxyles libres). Le détecteur à barrette de diodes utilisé a été le DAD-3000. Tous les solvants utilisés étaient de qualité HPLC. Les chromatogrammes des extraits/fractions ont été enregistrés dans la gamme de 200-300 nm et finalement centrée sur 270 et 225 nm selon les chromatogrammes. Les extraits/fractions testées ont été l'extrait brut méthanolique de *F. serratus*, cet extrait brut purifié par ultrafiltration grâce à différentes membranes mais aussi la fraction purifiée par purification liquide/liquide d'*H. siliquosa* et des fractions purifiées par Flash-Chromatographie d'*H. siliquosa*. Toutes les fractions obtenues ont été diluées dans de l'eau milliQ et filtrées à l'aide d'un filtre seringue dont la taille des pores était de 0,2 μm (FisherBrand™, Fisher Scientific™, Etats-Unis).

3.1.4.1 Mise en place de la méthode instrumentale

La première méthode instrumentale (n°1) qui a été mise en place s'est inspirée de celle de Kirke et al. (2017) : les phases mobiles comprenaient l'eau milliQ contenant 0,1 % d'acide formique (solvant A) et l'acétonitrile contenant 0,1 % d'acide formique (solvant B). Le débit était de 0,7 mL.min⁻¹. Le gradient d'éluion utilisé pour la méthode n°1 était le suivant : 0,5 % de B entre 0 et 21,8 min, 0,5-30 % de B entre 21,8 et 56,8 min, 30-90 % de B entre 56,8 et 61,2 min, 90-0,5 % de B entre 61,2 et 65,6 min, 0,5 % de B entre 65,6 et 66 min (Figure 2-23). La colonne a été chauffée à 40°C. Des temps d'analyses différents ont ensuite été testés à 40, 28 et 16 min, en gardant le même gradient de solvants : les méthodes n°2, 3 et 4 (Tableau 2-4). Pour cela, un extrait brut méthanolique de *F. serratus* a été injectée à un volume de 20 μL et une concentration de 5 mg.mL⁻¹. Deux autres méthodes ont été testées en modifiant la température de la colonne à 25 et 32°C : les méthodes n°5 et 6. Pour cela, une fraction purifiée par purification liquide/liquide d'*H. siliquosa* a été injectée à un volume de 10 μL et une concentration de 5,3 mg.mL⁻¹. Les

résultats obtenus sont présentés sous forme de chromatogramme avec l'absorbance mesurée à 270 nm (mAU) en fonction du temps (min).

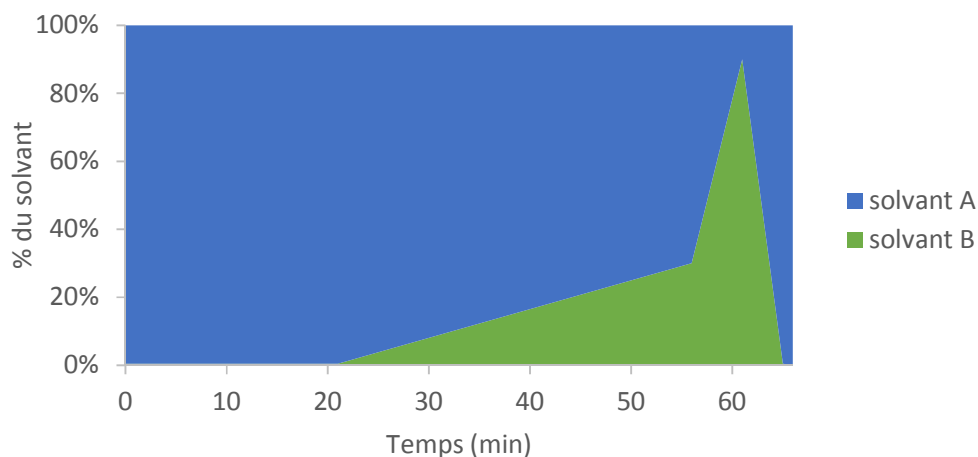


Figure 2-23 : Gradient de solvants de la méthode n°1 avec le solvant A, l'eau contenant 0,1% d'acide formique, et le solvant B, l'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique.

Tableau 2-4 : Différents gradients de solvants mis en place pour tester 6 méthodes instrumentales d'HPLC différentes avec 4 temps d'analyses différents et 3 températures de colonne différentes. Solvant B = Acétonitrile + 0,1 % d'acide formique. Le pourcentage restant correspond au solvant A (eau milliQ + 0,1 % d'acide formique).

	Temps en min						
	Méthodes	1	2	3	4	5	6
% du solvant B	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0,5	21,8	17,0	9,0	1,0	9,0	9,0
	30,0	56,8	32,0	20,0	10,0	20,0	20,0
	90,0	61,2	35,0	22,0	11,5	22,0	22,0
	0,5	65,6	38,0	25,0	14,0	25,0	25,0
	0,5	66,0	40,0	28,0	16,0	28,0	28,0
T° colonne (°C)	40	40	40	40	25	32	

3.1.4.2 Modification de l'acide et du pourcentage

Des essais ont été effectués avec la méthode instrumentale n°4 en modifiant le type d'acide contenu et son pourcentage dans les solvants de la phase mobile pour observer si cela impacte la résolution et la séparation des molécules. La méthode de départ contenait de l'acide formique à 0,1 %. Nous avons testé avec une bouteille neuve d'acide formique pour étudier l'impact de l'ancienneté du solvant sur l'analyse, et également avec de l'acide acétique. Pour cela, l'extrait brut méthanolique de *Fucus serratus* a été injecté à un volume de 20 µL et une concentration de 5 mg.mL⁻¹. Par la suite, des essais avec différents

pourcentages d'acide formique ont été effectués sur une fraction purifiée par purification liquide/liquide d'*Halidrys siliquosa* : 0, 0,05 ou 0,1 % d'acide formique. Le volume d'injection et la concentration de la fraction étaient de 20 μL et 5,3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivement. Pour les deux expériences, des chromatogrammes ont été obtenus avec l'absorbance (mAU) mesurée à 270 nm en fonction du temps (min).

3.1.5 MALDI-TOF/TOF

Le spectromètre de masse utilisé était le MALDI-TOF/TOF AuTOFLEX III de chez Bruker Daltonics (Etats-Unis), équipé d'un laser sous azote à 337 nm, en opérant en mode positif. Ce spectromètre de masse est disponible à la plateforme de Spectrométrie de Masse de l'UBO et les expériences ont été menées par Nelly Kervarec. La mise en place de cette méthode a été inspirée par les études de [Le Lann et al. \(2016\)](#) et [Vissers et al. \(2017\)](#). Différentes puissances de laser ont été testées : entre 20 et 70% à une fréquence de 20 Hz. Différents solvants de dilution de la fraction purifiée ont été testés : eau, méthanol, mélange eau:méthanol (50:50, v:v). Des concentrations différentes de la fraction purifiée ont également été déposées sur la plaque, appelée cible MTP384 (Bruker Daltonics). Des matrices variées ont également été testées : le HCCA (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique), le DHB (acide 2,5-dihydroxybenzoïque), le THAP (2,4,6-trihydroxyacétophénone) ou le dithranol. Le DHB a été testé avec différents pourcentages d'acétonitrile (30 ou 50%). Plusieurs méthodes de dépôt sur la cible sont également réalisables : dépôt du mélange matrice/échantillon directement sur la cible ou alors la méthode en couche ultra mince (UTL) ou dite en « sandwich » avec le dépôt de la matrice d'abord puis de l'échantillon. Pour être détectés, les composés phénoliques doivent être ionisables. Il est possible qu'ils ne s'ionisent pas complètement ou pas du tout ; ainsi, pour faciliter l'ionisation, on peut ajouter de l'acétate de sodium : le sodium va venir se fixer sur les composés phénoliques et les rendre ainsi ionisables ([Vissers et al., 2017](#)). Le protocole qui a permis d'obtenir un spectre avec les différentes masses est celui-ci : le DHB a été sélectionné comme matrice (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, dans un mélange eau:acétonitrile (70:30 v:v), mélange acidifié à 0,1% (v:v) de TFA ou acide trifluoroacétique). La fraction a été mélangée au DHB dans une proportion de 1:1. Ce mélange a ensuite été déposé sur la cible par pipetage de 1 μL de la solution, séchée sous l'air ambiant, additionnée de 2 μL supplémentaires puis de 1 μL d'acétate de sodium à 6,8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. La fraction testée a été purifiée par la méthode de purification liquide/liquide à partir d'un extrait de macération de *Fucus serratus* (juillet 2017). Cette fraction a été diluée dans du méthanol : 1 mg dans 500 μL de méthanol. La puissance de laser était de 70% à une fréquence de 20 Hz avec 1900 shots, qui correspond au nombre de fois où le laser a tapé sur l'extrait pour permettre l'ionisation.

3.2 Résultats et discussions

3.2.1 HPLC

3.2.1.1 Mise au point de la méthode

- Standards

Les standards, c'est-à-dire les molécules pures (phloroglucinol, pyrogallol et acide gallique) ont été observés par HPLC. Sur les 66 min du temps d'analyse de la méthode instrumentale n°1, les standards sont sortis de la colonne très rapidement entre 1 et 4 min, comme le montre la [Figure 2-24](#). Cette méthode nous permet bien de séparer ces molécules. Le phloroglucinol sort autour de 1,8 min alors que l'acide gallique se trouve à 2,4 min et le pyrogallol à 2,5 min. A 1,7 min, un pic est retrouvé pour les 3 standards, correspondant peut-être à une impureté. Lorsque l'on passe les 3 standards en même temps, nous retrouvons bien les pics des 3 standards : phloroglucinol à 1,8 min, l'acide gallique à 2,3 min et le pyrogallol à 2,5 min ([Figure 2-24](#)). Ensuite, différents volumes des solutions de phloroglucinol et pyrogallol ont été injectés pour obtenir des gammes étalon : la méthode n°1 nous a permis d'obtenir des gammes étalons avec des R^2 de 1 ([Figure 2-25](#)). La gamme étalon de l'acide gallique n'a pas été réalisée car c'est un composé phénolique ne se retrouvant pas chez les algues brunes, nous nous sommes donc concentrés sur le phloroglucinol et le pyrogallol.

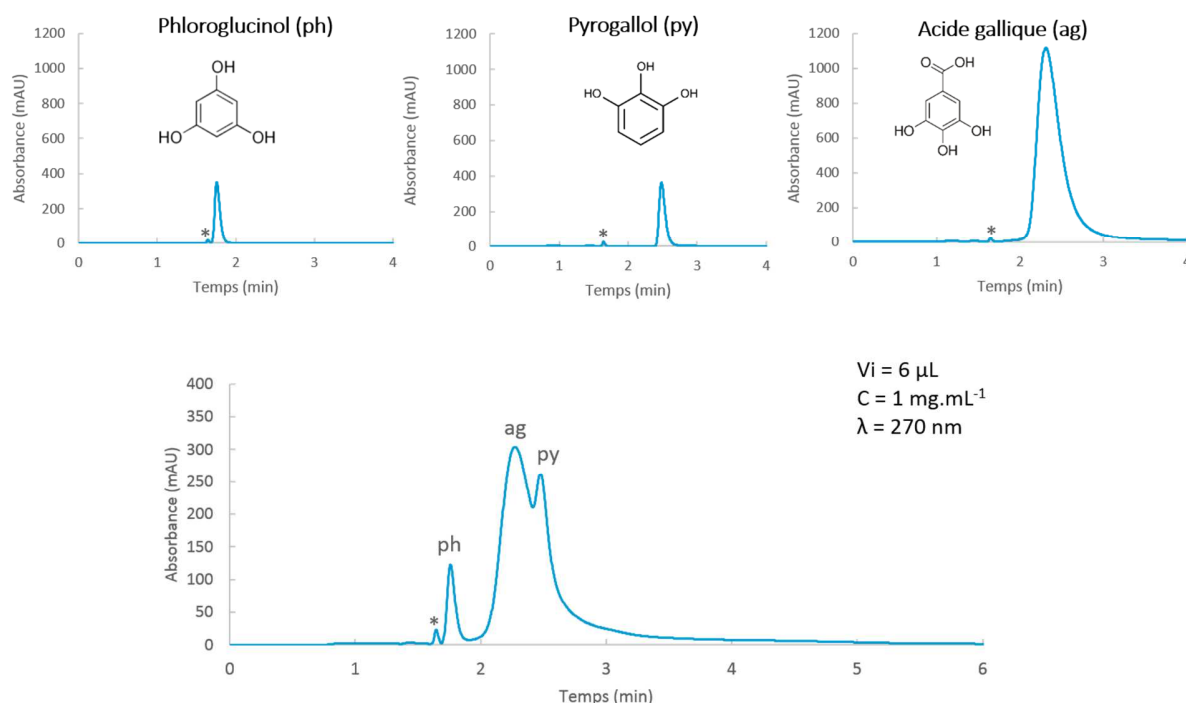


Figure 2-24 : Chromatogrammes des différents standards séparés (1 mg.mL^{-1} chacun) ou mélangés (1:1:1, v:v) : phloroglucinol, pyrogallol et acide gallique. Ils ont été obtenus avec la méthode instrumentale n°1 et ont été zoomés sur les 4 et 6 premières minutes de l'analyse. * = impuretés ?

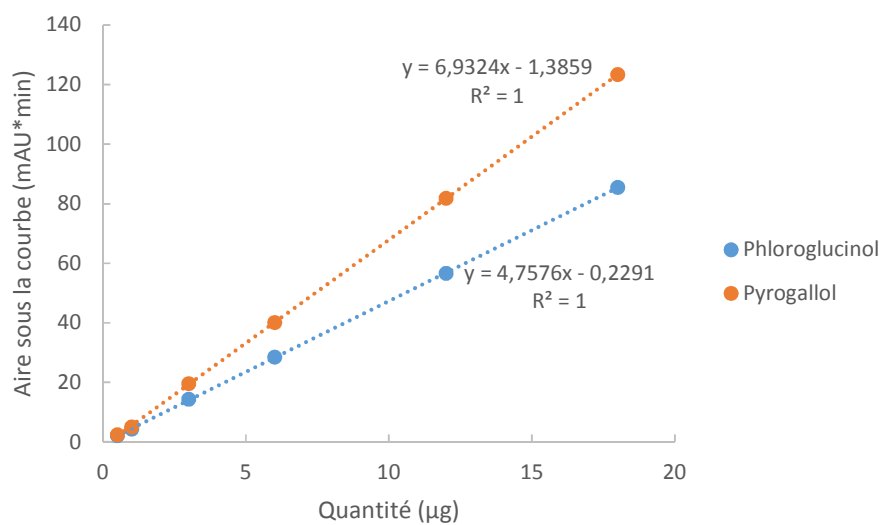


Figure 2-25 : Gammes étalon du phloroglucinol (en bleu) et du pyrogallol (en orange). (Longueur d'onde 270 nm).

- Méthode n°1

Le chromatogramme de l'extrait brut méthanolique enrichi en composés phénoliques de *Fucus serratus* obtenu avec la méthode n°1 est représenté sur la Figure 2-26. Deux zones se démarquent par la présence de pics : au tout début du chromatogramme entre 0 et 3 min et à la fin du chromatogramme entre 58 et 65 min. Dans cette première partie du chromatogramme, deux pics bien distincts apparaissent à 1,0 min, correspondant au plus petit pic à environ 38 mAU, et autour de 1,7 min pour le plus grand pic à environ 120 mAU. Ces pics pourraient correspondre à des composés phénoliques puisqu'ils sont présents dans la zone où sortent le phloroglucinol, le pyrogallol et l'acide gallique comme nous l'avons montré précédemment (Figure 2-24). Ce serait le cas notamment du pic sortant à 1,7 min qui pourrait correspondre au phloroglucinol. Dans la deuxième partie du chromatogramme, plusieurs pics apparaissent ne dépassant pas 40 mAU : un pic, avec une résolution plutôt faible car étalé, apparaît notamment à 60,0 min ainsi que plusieurs autres pics avec une meilleure résolution à 61,6, 62,2, 62,3 et 62,6 min. Les pics à 62,2 et 62,6 min sont retrouvés avec les standards également (données non présentées) suggérant une impureté de solvant ou due à la colonne.

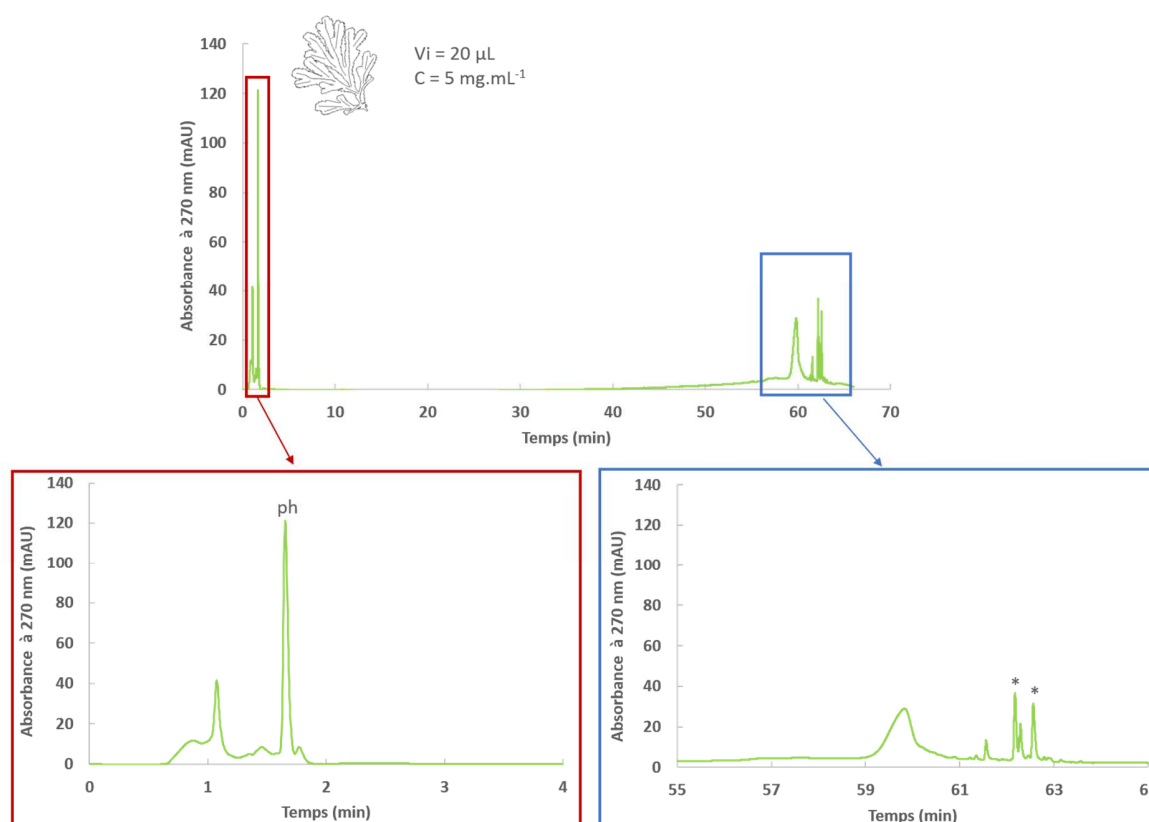


Figure 2-26 : Chromatogrammes obtenus avec l'extrait brut méthanolique de *Fucus serratus* (5 mg.mL^{-1}) en utilisant la méthode instrumentale n°1. Les chromatogrammes du bas correspondent à des zooms de ceux du haut entre 0 et 4 min (à gauche) et entre 55 et 65 min (à droite). ph = phloroglucinol, * = impuretés ?

- Modification du temps d'analyse

Des temps d'analyses différents ont été testés pour observer la présence ou non de mêmes pics et d'une même résolution de ces pics. Cette expérience a été menée sur l'extrait brut méthanolique de *Fucus serratus* (obtenu avant l'ultrafiltration, cf. page 164). Si l'on regarde les chromatogrammes obtenus avec les 4 méthodes dans leur totalité, des pics sont obtenus au début de l'analyse, avant 5 min, et à la fin de l'analyse, après 60 min, comme observé pour la méthode 1 précédemment (Figure 2-27).

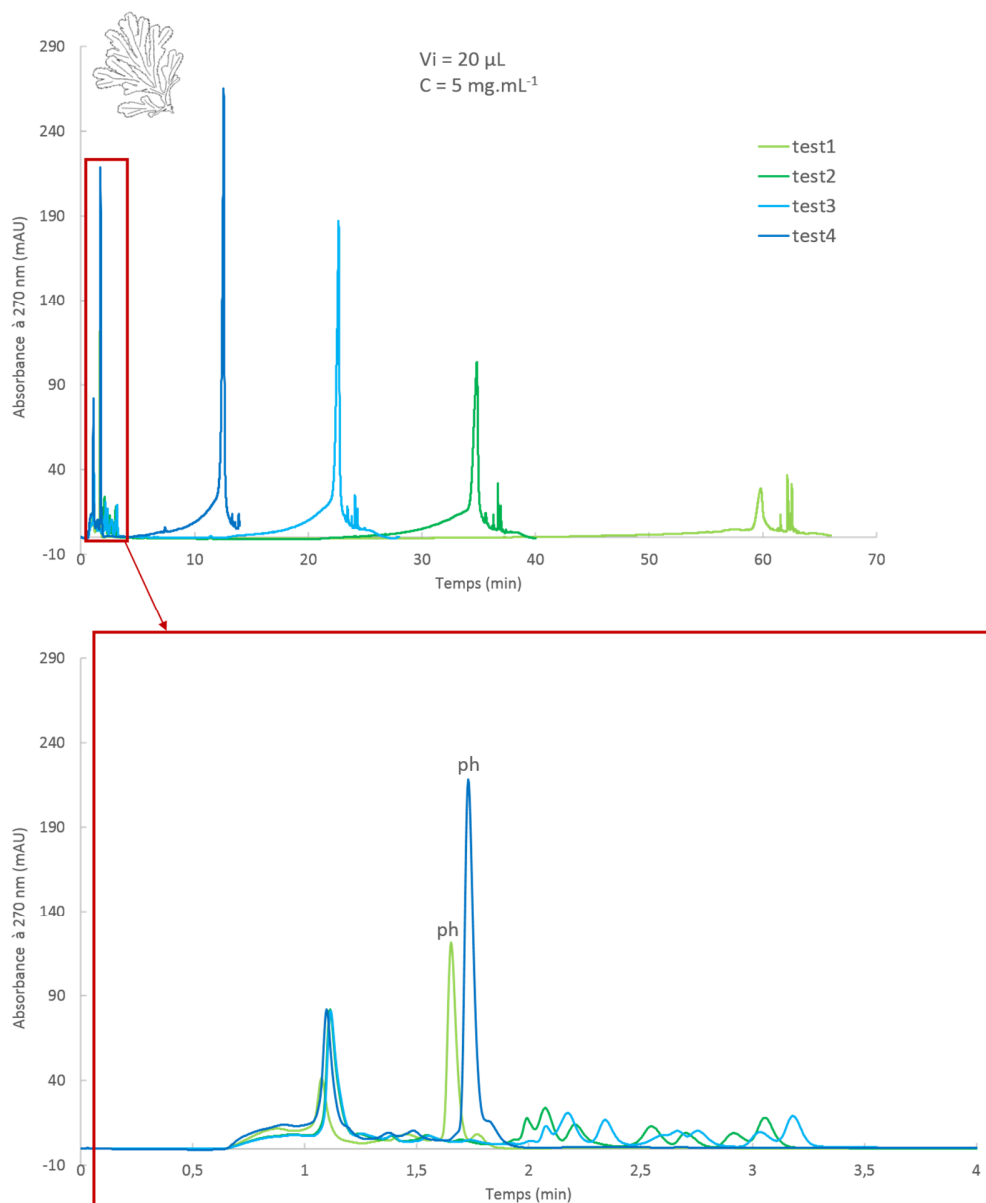


Figure 2-27 : Chromatogrammes obtenus avec l'extrait brut méthanolique de *Fucus serratus* (5 mg.mL^{-1}) en utilisant 4 méthodes instrumentales avec des temps d'analyses différents : test 1 = 66 min, test 2 = 40 min, test 3 = 28 min et test 4 = 16 min. Les chromatogrammes du bas correspondent à des zooms de ceux du haut entre 0 et 4 min. ph = phloroglucinol.

Lorsque l'on zoome sur la partie où des pics apparaissent en début de chromatogramme, c'est-à-dire entre 0 et 4 min, nous obtenons deux pics pour les méthodes n°1 (66 min) et n°4 (16 min) et seulement 1 pic principal pour les méthodes n°2 (40 min) et 3 (28 min).

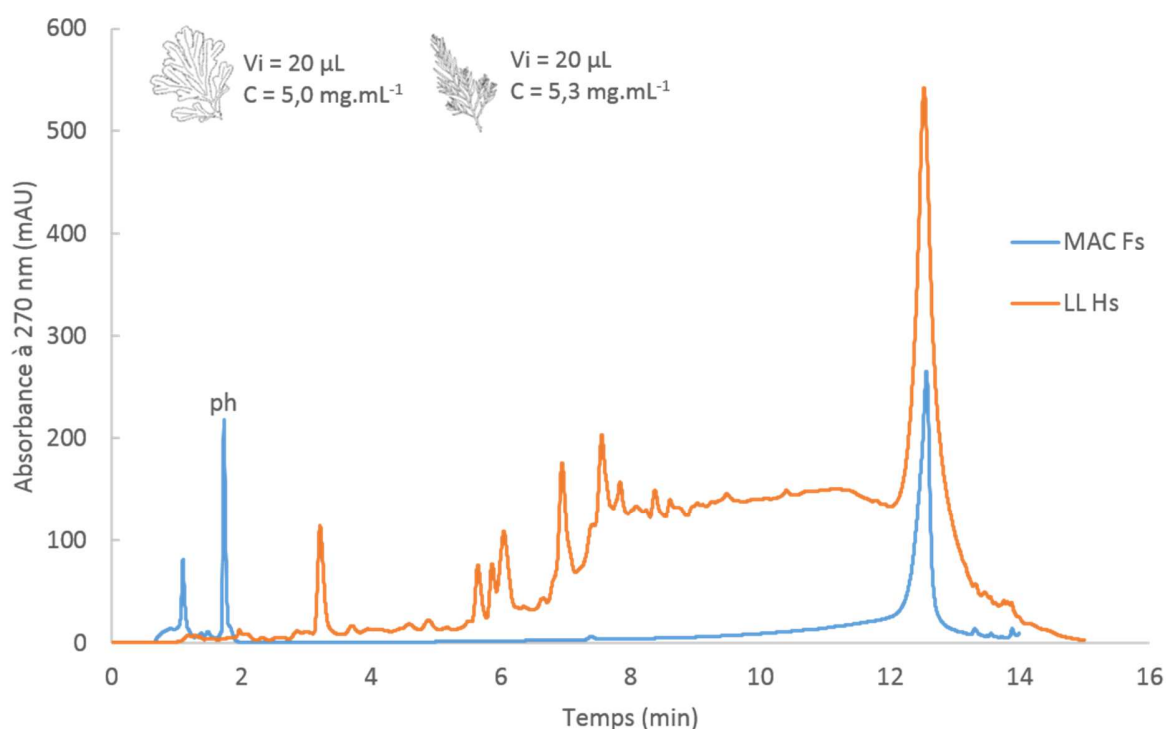
Le premier pic autour de 1,1 min est retrouvé avec les 4 méthodes mais avec des intensités différentes : 40 mAU pour la méthode n°1, 80 mAU pour les méthodes n°2 et 3, et enfin 77 mAU pour la méthode n°4. Le pic que nous avons trouvé préalablement pour le phloroglucinol à 1,7 min se retrouve également mais seulement pour les méthodes n°1 et 4. Simplement en modifiant le temps d'analyse, ce pic disparaît pour les méthodes n°2 et 3. L'intensité de ce pic est plus forte pour la méthode n°4 avec 216 mAU, que pour la méthode n°1 avec 113 mAU. Nous observons que la ligne de base pour les méthodes n°2 et 3 est beaucoup moins résolue que pour les méthodes n°1 et 4. Cette disparition de pic n'est sûrement pas due au temps d'analyses différents mais à l'extrait qui a réagit peut-être de manière différente. Provenant du même échantillon, cela peut être dû à une transformation des composés lors du passage de la colonne. Cela ne peut pas être une dégradation de l'extrait puisque nous avons retrouvé le pic pour la méthode n°4 à la suite des 3 autres méthodes.

Si nous regardons maintenant la deuxième partie du chromatogramme, les pics retrouvés avec la méthode n°1 sont également retrouvés avec les 3 autres méthodes mais avec des intensités différentes. En effet, le premier pic obtenu à 59,8 min et 29 mAU est retrouvé à 34,9 min et 101 mAU pour la méthode n°2, à 22,7 min et 183 mAU pour la méthode n°3 et à 12,6 min et 262 mAU pour la méthode n°4. Pour les pics de la première partie du chromatogramme, la résolution des pics ne semble pas être modifiée en diminuant le temps d'analyse, un temps d'analyse plus court que 66 min est donc plus judicieux pour gagner en temps. Globalement, le temps d'analyse est de l'ordre de 30 min dans les autres études menées sur les phlorotannins avec un débit de 0,5 mL.min⁻¹ (Sugiura et al., 2007 ; Tierney et al., 2014 ; Heffernan et al., 2015a, b ; Kirke et al., 2017) ou 0,4 mL.min⁻¹ (Vissers et al., 2017). Cependant dans certaines publications, le temps d'analyse est plus court, 17 min à 0,3 mL.min⁻¹ pour Hermund et al. (2018), ou plus long, 45 min à 1 mL.min⁻¹ pour Rajauria (2018), 50 min à 1 mL.min⁻¹ pour Chowdhury et al. (2014) ou 60 min à 0,2 mL.min⁻¹ pour Lee et al. (2014b).

Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale

- Méthode n°4 (16 min) : extrait méthanolique de *Fucus serratus* vs fraction purifiée d'*Halidrys siliquosa*

La fraction purifiée acétate d'éthyle par purification liquide/liquide enrichie en composés phénoliques d'*Halidrys siliquosa* (LL Hs) a été analysée avec la méthode n°4 (16 min) et comparée avec l'extrait brut méthanolique obtenu par macération de *Fucus serratus* (MAC Fs) (Figure 2-28). Les pics présents au début du chromatogramme n'ont pas été retrouvés pour la fraction purifiée d'*H. siliquosa*, cependant nous retrouvons le pic de la fin du chromatogramme à 12,7 min pour l'extrait MAC Fs et 12,5 min pour la fraction LL Hs. La fraction purifiée d'*H. siliquosa* contient une teneur beaucoup plus élevée que l'extrait puisqu'il y a eu une étape de purification en plus : tous les pics apparaissant en plus sur le chromatogramme de la fraction LL Hs sont donc normalement des composés phénoliques. De plus, ce sont deux algues différentes présentant des phlorotannins de différentes natures (Steevensz et al., 2012 ; Tierney et al., 2014 ; Le Lann et al., 2016).



Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale

- Modification du type d'acide et du pourcentage d'acide dans le solvant A de la phase mobile

L'extrait méthanolique de *Fucus serratus* a été analysé par HPLC avec la méthode n°4 en modifiant le type d'acide dans le solvant A de la phase mobile : de l'acide formique, provenant de deux bouteilles, et de l'acide acétique. Des pics sont obtenus au début et tout à la fin du chromatogramme comme dans l'expérience précédente (Figure 2-29).

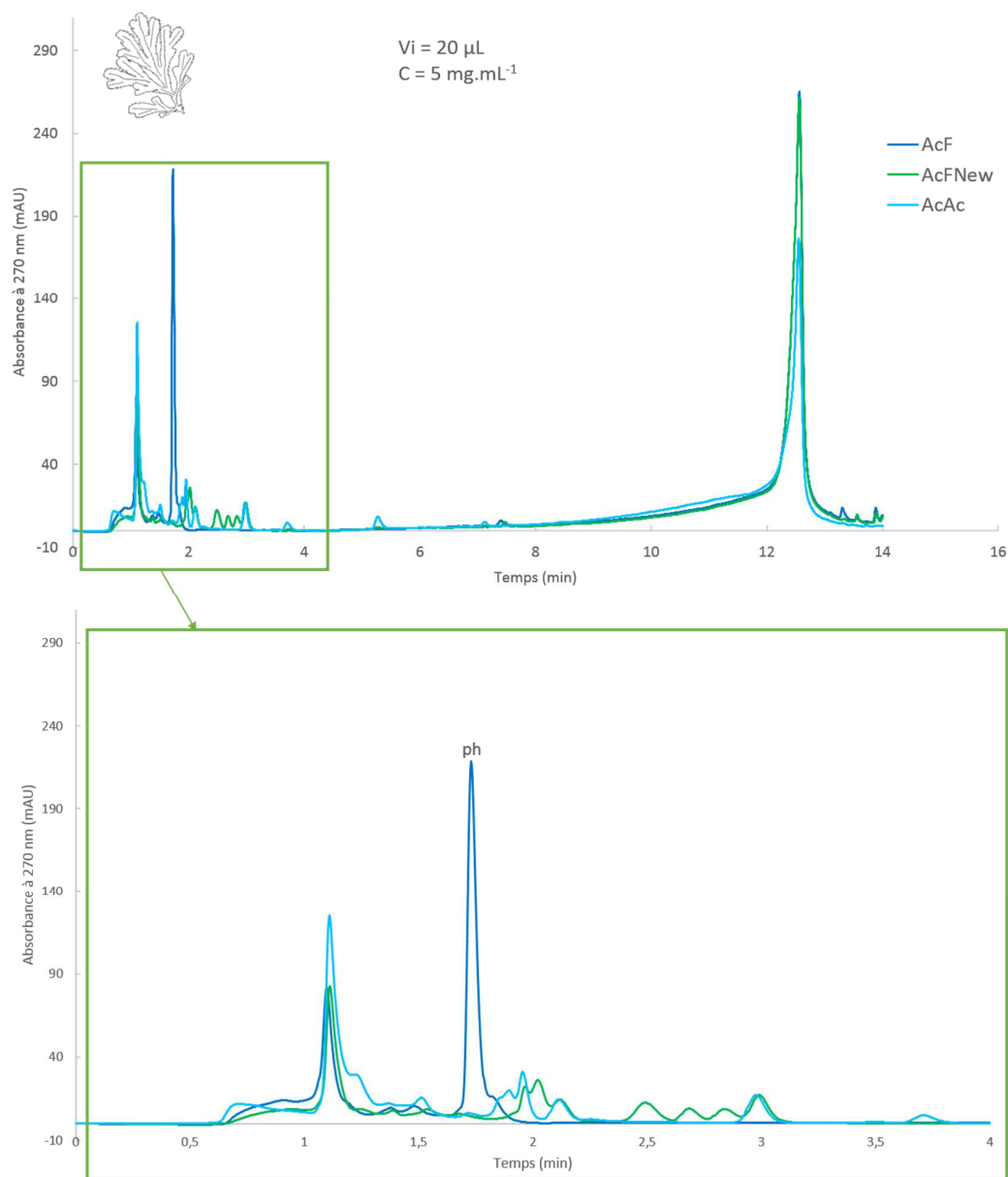


Figure 2-29 : Chromatogrammes obtenus avec l'extrait brut méthanolique de *Fucus serratus* (5 mg.mL^{-1}) en utilisant la méthode n°4 en changeant l'acide dans le solvant A à une concentration de 0,1 % : AcF = acide formique, AcFNew = acide formique d'une bouteille neuve, AcAc = acide acétique. ph = phloroglucinol

Si l'on zoome davantage sur la zone entre 0 et 4 min, le pic que l'on observait à 1,7 min dans l'expérience précédente dans les méthodes n°1 et 4, correspondant sûrement au phloroglucinol, apparaît seulement avec l'acide formique de l'ancienne bouteille alors qu'il n'apparaît pas avec l'acide formique de la nouvelle bouteille et l'acide acétique. Cependant, le premier pic à 1,1 min d'analyse a été retrouvé pour les 3 analyses avec les acides différents. De plus, le profil de l'analyse avec l'acide formique de la nouvelle bouteille ressemble davantage à celui avec l'acide acétique plutôt qu'avec celui de l'acide formique de l'ancienne bouteille, notamment par la présence de petits pics entre 2 et 3,5 min d'analyse, montrant une ligne de base moins résolue qu'avec l'acide formique de l'ancienne bouteille. L'analyse a donc été réalisée sur un autre extrait, cette fois-ci une fraction purifiée d'*Halidrys siliquosa* obtenue par purification liquide/liquide (cf. page 104) en changeant le pourcentage d'acide formique (Figure 2-30).

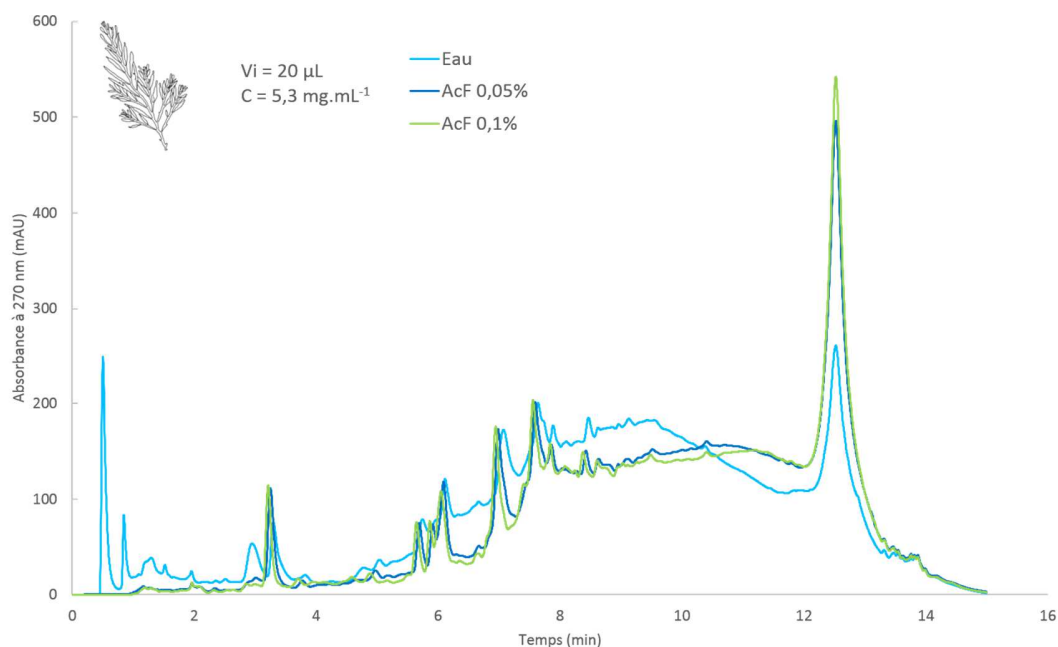


Figure 2-30 : Chromatogrammes obtenus avec la fraction purifiée d'*Halidrys siliquosa* (5,3 mg.mL⁻¹) en utilisant la méthode n°4 en modifiant le pourcentage d'acide formique dans le solvant A de la phase mobile. Eau = 0 % d'acide formique dans le solvant A, AcF 0,05 % = 0,05 % d'acide formique, AcF 0,1 % = 0,1 % d'acide formique.

Une différence plus marquée a été mise en évidence lorsqu'il n'y a pas d'acide formique et lorsqu'il y en a quelque soit le pourcentage 0,05 ou 0,1% : la résolution des pics est moins élevée sans acide formique notamment au niveau de la bosse entre 5 et 12 min, correspondant sûrement aux phlorotannins. La présence de pics différents a également été remarquée : sans acide formique, des pics à 0,5 et 0,8 min ont été mis en évidence, comme si les composés n'étaient pas retenus par la colonne et sortaient dès le début. Par ailleurs, l'intensité et la résolution du dernier grand pic obtenu à 12,5 min ont été meilleures avec de l'acide formique. Entre les deux concentrations différentes d'acide formique, la résolution des pics pour la

totalité du chromatogramme est encore meilleure à la concentration la plus élevée à 0,1%. Dans la littérature, de nombreuses publications utilisent l'acide formique dans les solvants HPLC pour séparer les phlorotannins (Lee et al., 2014b ; Tierney et al., 2014 ; Heffernan et al., 2015a et b ; Kirke et al., 2017 ; Vissers et al., 2018). L'acide acétique est parfois utilisé, comme Rajauria (2018) ce qui lui a permis d'avoir une bonne résolution de pics. Ce dernier auteur a testé deux concentrations d'acide acétique, 0,1 et 0,25 %, et a obtenu la meilleure séparation avec l'acide acétique à 0,25 %.

- Modification de la température du four de la colonne

La température de la colonne joue un rôle essentiel dans la détection des composés par HPLC. Nous avons fait varier cette température en testant les trois températures suivantes, 25 (méthode n°5), 32 (méthode n°6) et 40°C (méthode n°3), avec la fraction purifiée d'*Halidrys siliquosa* obtenue par purification liquide/liquide. Nous avons sélectionné un temps d'analyse de 28 min correspondant à la méthode n°3. Dans notre étude, 25°C permet d'avoir une ligne de base intéressante mais avec un pic négatif au début de l'analyse et des pics trop importants sur la fin provoquant une remontée de la ligne de base, moins importante à 32° et 40°C (Figure 2-31).

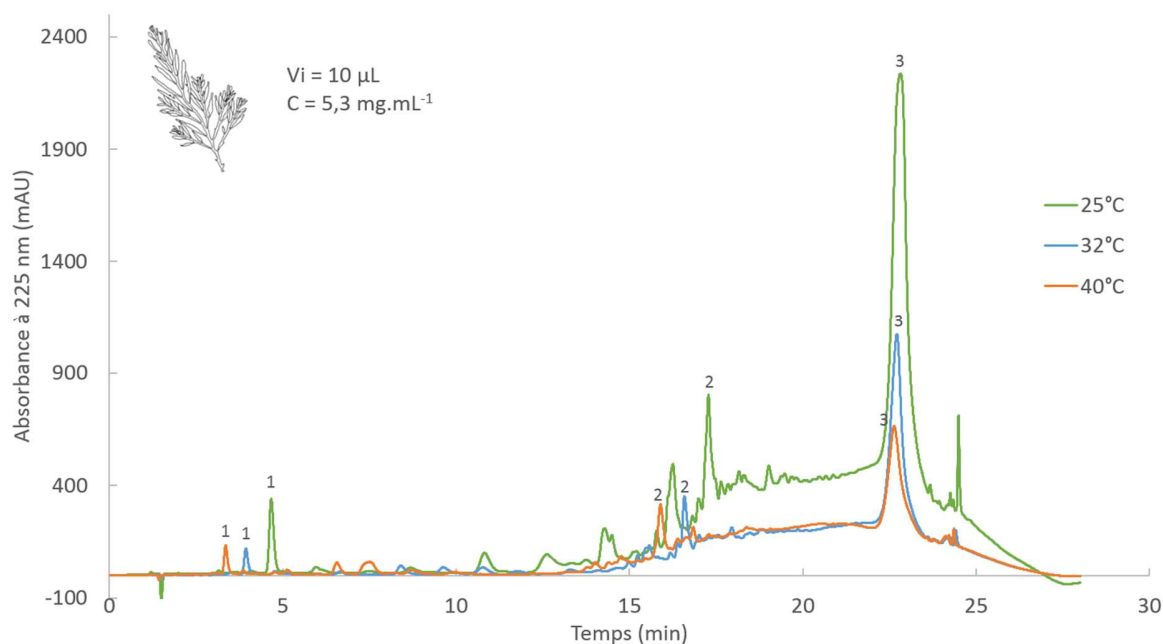


Figure 2-31 : Chromatogrammes obtenus avec la fraction purifiée enrichie en composés phénoliques d'*Halidrys siliquosa* (5,3 mg.mL⁻¹) en utilisant différentes températures de colonne : 25°C (méthode n°5), 32°C (méthode n°6) et 40°C (méthode n°3).

La différence est la plus marquée entre les chromatogrammes obtenus à 25°C et ceux à 32° et 40°C. Nous observons qu'avec l'augmentation de la température, des pics apparaissent plus vite. En effet, plus la température chauffe, plus le pic n°1 apparaît plus vite : 4,7 min à 25°C, 3,9 min à 32°C et 3,4 min à 40°C. L'augmentation de la température permettrait de séparer plus rapidement les molécules. La même chose est observée pour des pics autour de 16 min (pic n°2), mais n'est pas observée pour le grand pic observé à la fin (pic n°3) des trois chromatogrammes. Plus la température augmente, plus ce grand pic diminue. Cependant, la séparation des pics est davantage résolue à 32°C qu'à 40°C. La température de 32°C semble donc être un bon compromis. La température de 40°C est régulièrement retrouvée dans les études scientifiques (Lee et al., 2014b ; Tierney et al., 2014 ; Heffernan et al., 2015a et b ; Kirke et al., 2017). Rajauria (2018) a testé différentes températures de la colonne : 20, 25, 30 et 35°C. Elle a montré que plus la température augmentait plus les valeurs d'absorbance maximale diminuaient. C'est le cas dans notre étude également. Pour des températures à 20°C, les chromatogrammes obtenus par Rajauria (2018) ont une bonne ligne de base tandis qu'au-delà de 20°C les pics ont obtenu une meilleure résolution. De plus, un certain élargissement des pics est observé à 30 et 35°C. Néanmoins, dans l'étude de Rajauria (2018), la température ne semble avoir aucun effet sur le temps de rétention et donc la séparation des composés actifs des algues, à l'inverse de notre étude. La chercheuse a donc sélectionné la température de 25°C pour une séparation chromatographique optimale.

3.2.1.2 Analyses des différentes fractions obtenues par différentes méthodes de purification

- Fractions obtenues par ultrafiltration sur *Fucus serratus* (méthode n°1)

Les différentes fractions obtenues par ultrafiltration à partir de l'extrait brut méthanolique de *Fucus serratus* ont été analysées par HPLC : les trois réténats et un filtrat, le plus petit (inférieur à 3 kDa), ainsi que l'extrait brut de départ. Si l'on regarde le chromatogramme général représenté en haut de la Figure 2-32, des pics ont été seulement observés au début (< 2 min) et à la fin (> 60 min) du chromatogramme. Si l'on agrandit le début du chromatogramme, deux pics sont retrouvés avec toutes les fractions et l'extrait brut : vers 1,1 min et 1,7 min. Le deuxième pic peut correspondre au phloroglucinol qui se retrouvait aussi à 1,7 min avec la méthode n°1 (cf. page 107). Le phloroglucinol, ayant un poids de 126 Da, se retrouve ainsi dans l'ensemble des fractions analysées alors qu'il devrait se retrouver uniquement dans l'extrait brut et le filtrat inférieur à 3 kDa.

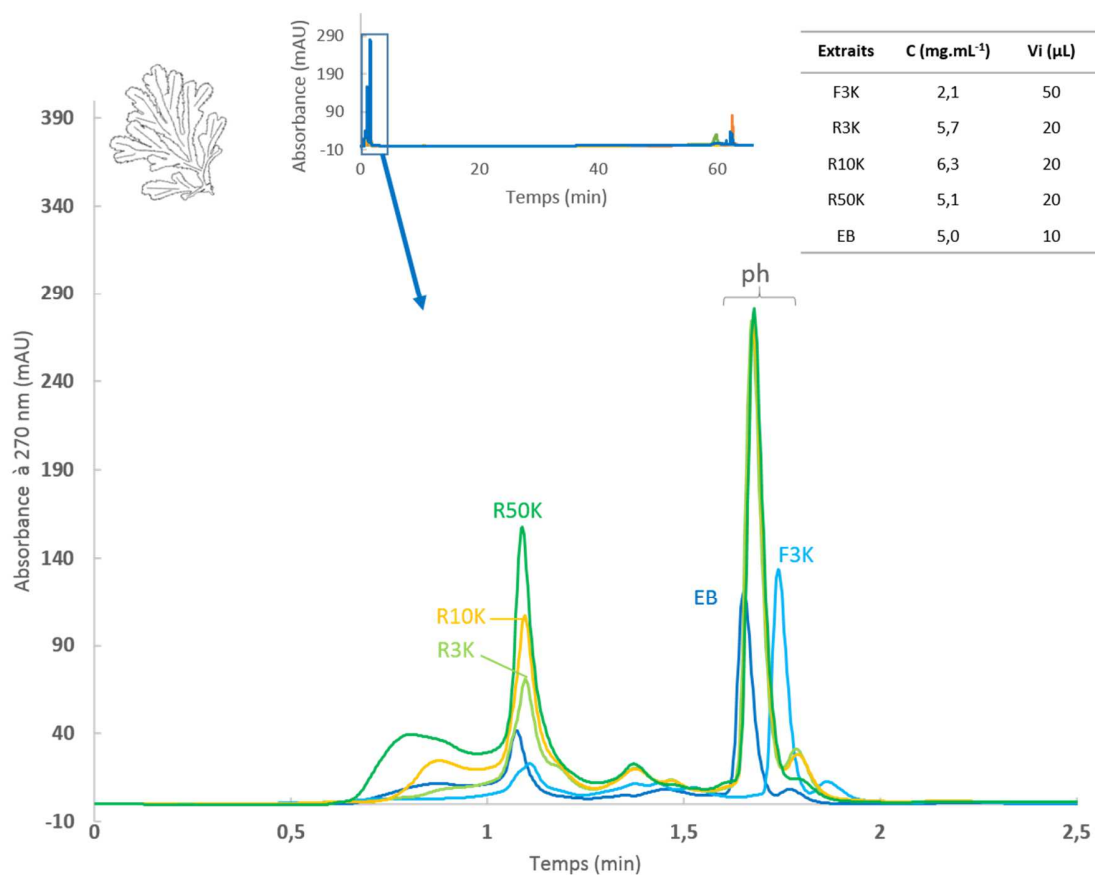


Figure 2-32 : Chromatogrammes des différentes fractions obtenues par ultrafiltration à partir de l'extrait brut de *Fucus serratus* en utilisant la méthode n°1 : l'extrait brut (EB), les réténats supérieurs à 50 kDa (R50K), à 10 kDa (R10K), à 3 kDa (R3K) et le filtrat inférieur à 3 kDa (F3K). ph = phloroglucinol.

Les fractions obtenues par ultrafiltration avec un extrait d'*Halidrys siliquosa* ont également été analysées (Figure 2-33). Pour toutes les fractions, nous observons deux pics entre 1 et 2 min avec le principal présent à 1,7 min comme le phloroglucinol, alors que nous ne l'avions pas observé encore pour les extraits d'*Halidrys siliquosa*. Comme pour les fractions de *F. serratus*, nous le retrouvons dans toutes les fractions alors que le poids moléculaire du phloroglucinol est de 126 Da. L'ultrafiltration n'a donc peut-être pas fonctionnée, les cartouches étant de plus anciennes.

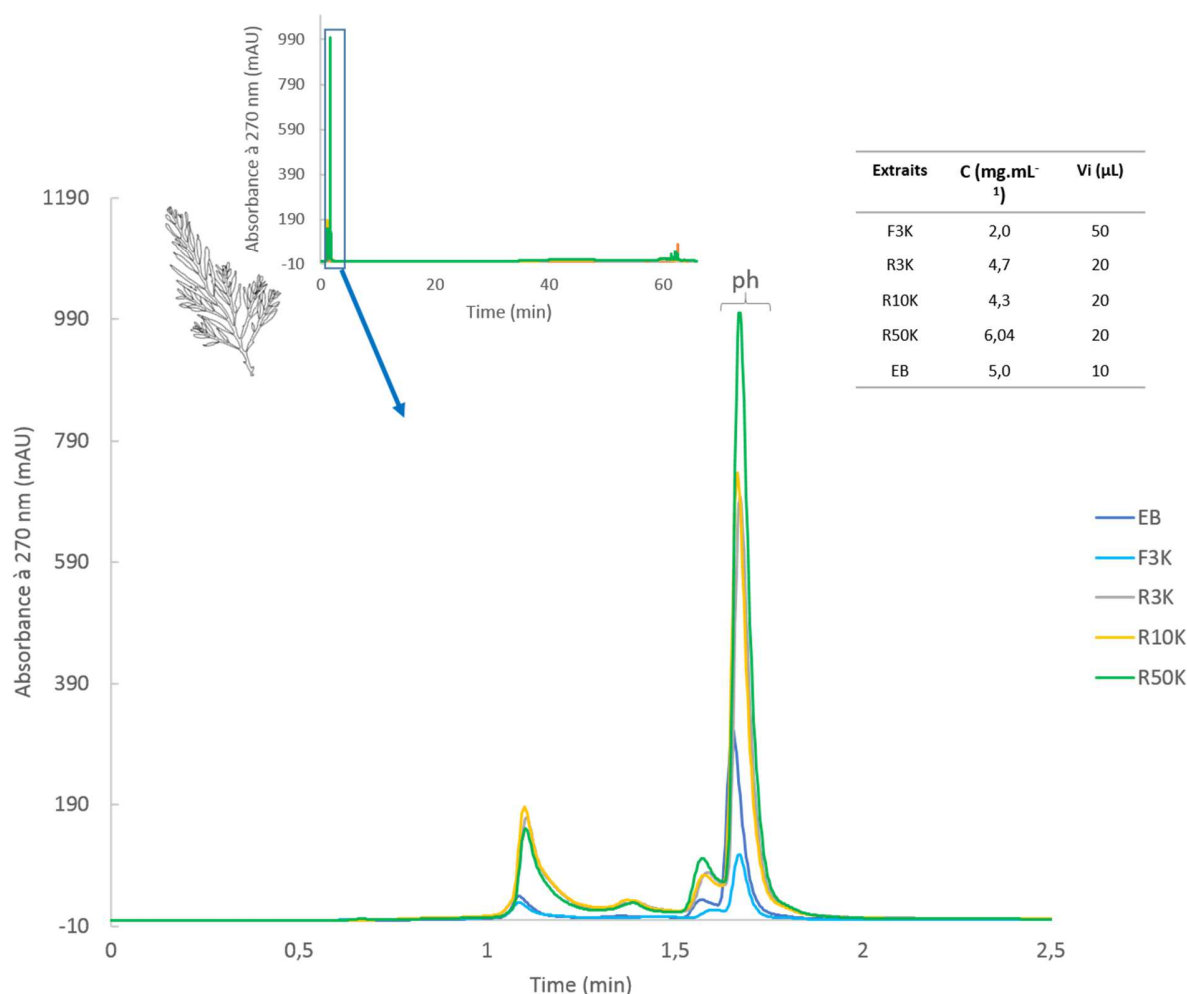


Figure 1-33: Chromatogrammes des différentes fractions obtenues par ultrafiltration à partir de l'extrait brut d'*Halidrys siliquosa* en utilisant la méthode n°1 : l'extrait brut (EB), les réténats supérieurs à 50 kDa (R50K), à 10 kDa (R10K), à 3 kDa (R3K) et le filtrat inférieur à 3 kDa (F3K). ph = phloroglucinol.

- Fractions obtenues par Flash-Chromatographie (FC)

Seules certaines fractions obtenues par Flash-Chromatographie sur un extrait brut d'*Halidrys siliquosa* ont été analysées en HPLC (méthode n°6). Les chromatogrammes obtenus n'ont pas les mêmes profils suggérant ainsi une purification efficace de l'extrait (Figure 2-34). Le pic au tout début du chromatogramme à 1,1 min a été retrouvé pour toutes les fractions cependant avec une intensité diminuant lors de l'augmentation du pourcentage d'éthanol : de 948 mAU pour la fraction FC-H2O à 28 mAU pour la fraction FC-EtOH60. Pour la fraction FC-H2O, plus de pics sont apparus au début du chromatogramme entre 0 et 5 min, cependant ne dépassant pas 240 mAU à 2,4, 3,3, 4,4 et 4,9 min. Plusieurs pics en commun ont été mis en évidence entre les fractions FC-H2O et FC-EtOH20 : c'est le cas du pic à 3,9 min avec une intensité plus forte pour la fraction FC-H2O (786 mAU) que la fraction FC-EtOH20 (299 mAU) mais aussi des pics à 6,8 et 8,3 min qui ont la même intensité. Nous observons pour toutes les fractions qu'à partir de 12 min, la ligne de base s'élève. Cette ligne de base levée est suivie d'une large bosse, la plus importante pour la fraction FC-EtOH20, comme nous l'avons observé précédemment pour la fraction purifiée obtenue par purification liquide/liquide d'*H. siliquosa* (cf. page 104). Par dosage du Folin-Ciocalteu, la fraction la plus riche en composés phénoliques était la fraction EtOH20 (cf pages 106-107). Cette bosse pourrait donc correspondre possiblement aux phlorotannins, avec de nombreux pics mal

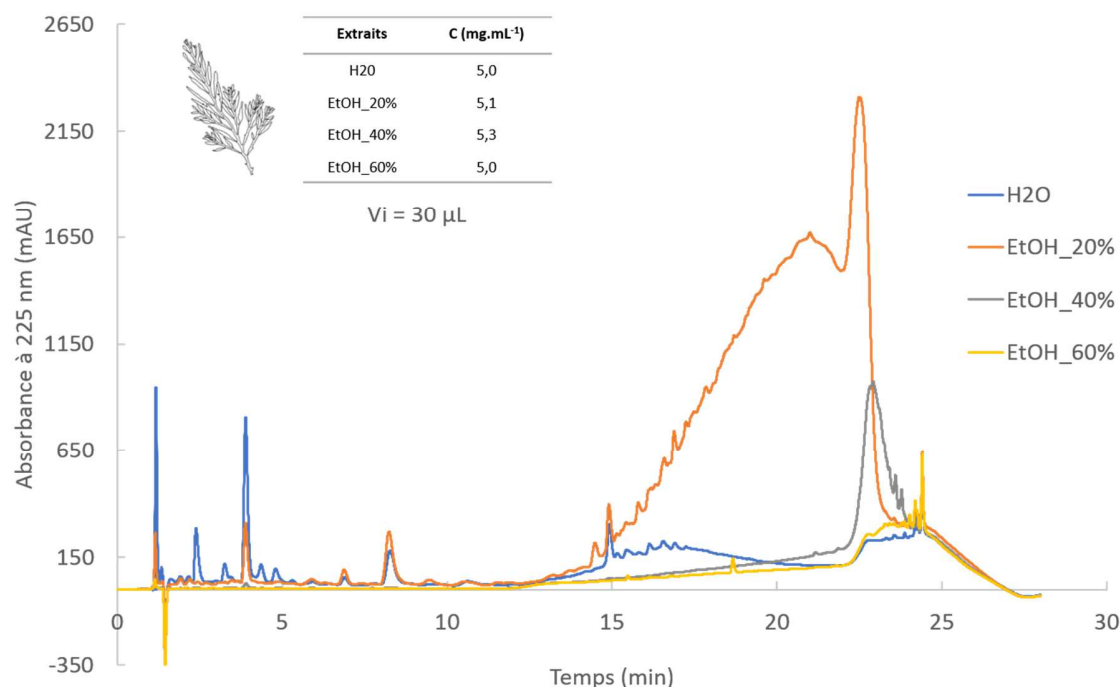


Figure 2-34 : Chromatogrammes de fractions obtenues par Flash-Chromatographie à partir de l'extrait brut ASE d'*Halidrys siliquosa* en utilisant la méthode n°6 (28 min, 32°C). EtOH = éthanol.

Chapitre 2 : Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques jusqu'à leur identification structurale

résolus. Les fractions FC-H₂O et FC-EtOH₄₀ contiennent également des CP mais en plus faibles teneurs d'où le fait d'observer également une bosse plus faible pour ces fractions et notamment pour la fraction H₂O. En effet, au début de la bosse, les fractions FC-H₂O et FC-EtOH₂₀ ont un pic en commun à 15,0 min. Par ailleurs, le grand pic retrouvé à la fin du chromatogramme de la fraction purifiée par purification liquide/liquide d'*H. siliquosa* a également été mis en évidence sur le chromatogramme de la fraction FC-EtOH₂₀ et beaucoup plus faiblement pour la fraction FC-EtOH₄₀.

3.2.2 MALDI-TOF/TOF

Un seul spectre a permis d'obtenir des signaux intéressants et pouvant correspondre aux phlorotannins : il a été obtenu en utilisant la fraction purifiée par purification liquide/liquide d'un extrait de *Fucus serratus* (Figure 2-35).

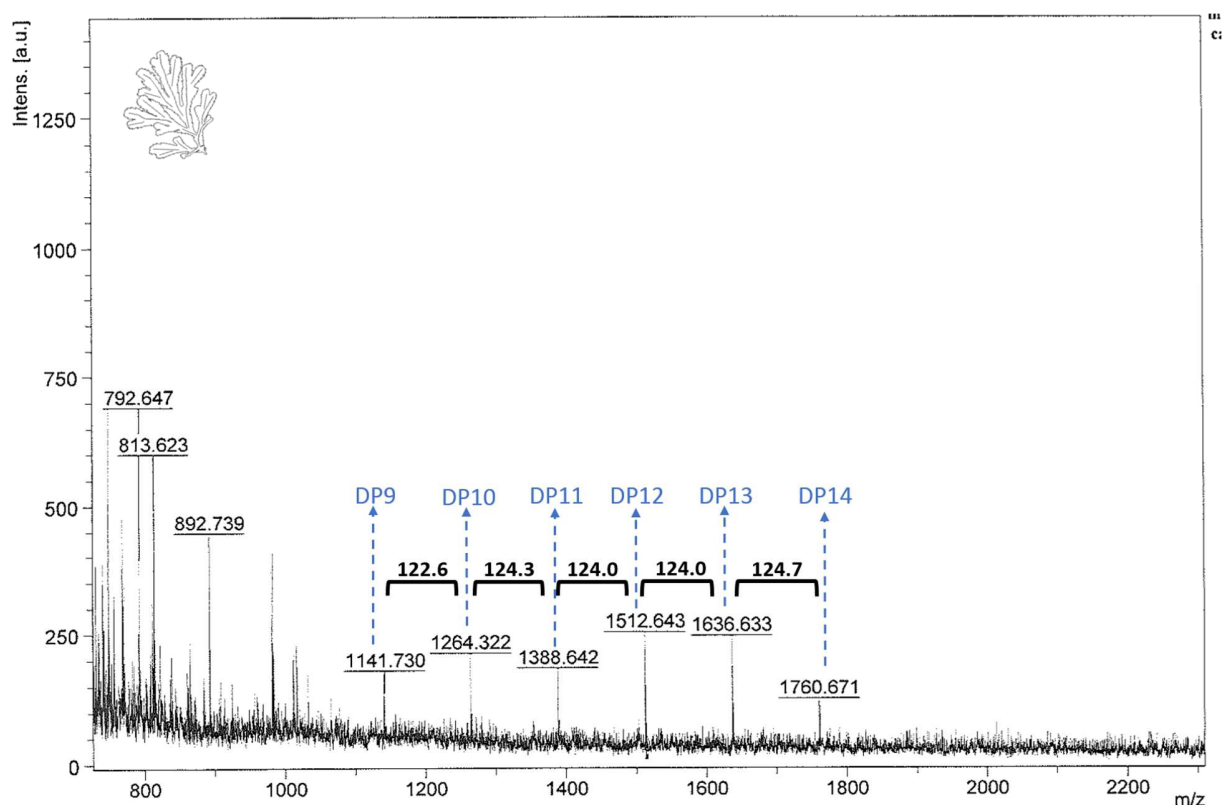


Figure 2-35 : Spectre obtenu par MALDI-TOF/TOF de la fraction purifiée par purification liquide/liquide d'un extrait de *Fucus serratus*.

La masse du phloroglucinol correspond à 126 Da, et 1 degré de polymérisation correspond à DP1 c'est-à-dire à une unité de phloroglucinol à 126 Da. La présence d'oligomères de degré de polymérisation entre DP7 et DP14, sur le spectre entre 700 et 2200 Da, a été retrouvée. Les différences de masses retrouvées entre les pics sont inférieures à 126 Da, plutôt 124 Da, la masse du phloroglucinol moins deux atomes d'hydrogène (H), pour créer une liaison covalente. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par [Vissers et al. \(2017\)](#) : ces auteurs ont retrouvé des phlorotannins dans une fraction purifiée par Flash-Chromatographie de *Laminaria digitata* avec des DP entre 7 et 27, entre 700 et 4000 Da. La matrice (DHB) possède une masse de 272 Da, et étant en grande quantité, le DHB possède un grand pic majoritaire qui peut cacher d'autres signaux. C'est donc pourquoi nous avons évité de regarder avant 700 Da. Pour cette zone, il faudrait trouver une autre matrice appropriée : ainsi il y aurait une matrice adaptée pour les phlorotannins à faible poids moléculaire et une matrice pour les phlorotannins à haut poids moléculaire.

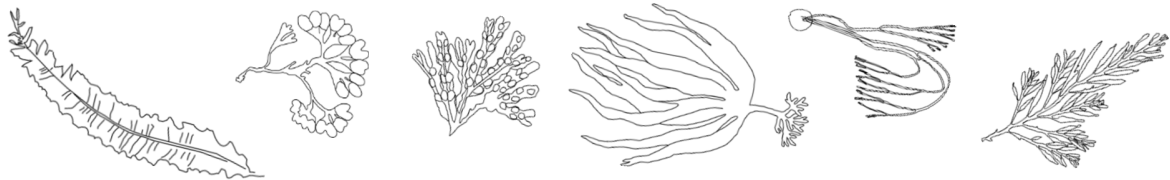
Les composés phénoliques sont des molécules peu ionisables d'où le fait d'avoir des difficultés à obtenir un spectre et le peu d'articles scientifiques publiés (e.g. [Vissers et al., 2017](#)). Une des spécificités du MALDI-TOF/TOF est la cristallisation de l'échantillon et de la matrice sur la cible : cette cristallisation dépend de la température, de la lumière, des courants d'air. Il serait intéressant de réaliser tout le temps de la même manière le dépôt de ce mélange, comme par exemple sous une cloche avec un flux d'azote à l'abri de toutes variations environnementales lors de la cristallisation, pour ainsi éviter l'oxydation des phlorotannins qui sont des molécules qui s'oxydent facilement et qui confèrent leur activité antioxydante ([Jiménez-Escrig et al., 2001](#) ; [Cornish & Garbary, 2010](#)).

3.3 Conclusion

Que ce soit pour l'HPLC ou le MALDI-TOF/TOF, ce sont des mises au point de méthodes qui ont été initiées au cours de cette thèse. Cependant, la méthode HPLC a permis de séparer efficacement les molécules et d'obtenir des chromatogrammes avec plusieurs pics différents selon les espèces d'algues mais aussi selon les méthodes d'extraction ou de purification. Pour valider la méthode HPLC, la perspective est de coupler la chaîne HPLC avec un autre détecteur, un spectromètre de masse qui pourra nous valider la présence des phlorotannins. Des essais préliminaires ont été effectués sur une chaîne HPLC avec un spectromètre de masse LTQ Orbitrap XL, n'apportant pour l'instant pas de résultats puisque le phloroglucinol n'est même pas détecté (problème d'ionisation ou de détection par le spectromètre). Des études supplémentaires doivent être envisagées. Concernant le MALDI-TOF/TOF, un seul spectre a été obtenu pour l'instant, avec une résolution correcte et l'apparition de pics séparés par une unité de phloroglucinol. Nous aurions donc des phlorotannins ayant des degrés de polymérisation entre 7 et 14 dans la fraction purifiée de *Fucus serratus*. Cependant, n'ayant pas réussi à obtenir de nouveau un tel spectre, il est nécessaire de continuer en essayant d'avoir le moins de variations environnementales lors de la cristallisation de l'échantillon sur la matrice.



Chapitre 3 : Quelle ressource algale pour la valorisation en cosmétique ?



1. Introduction

Les macroalgues représentent une matière première intéressante à valoriser, étant donné leur richesse en principes actifs pouvant intéresser divers domaines industriels (cf. Chapitre 1). En France, elles peuvent être récoltées à l'état sauvage mais aussi être cultivées en pleine mer, le long du littoral ou en bassins (Balay et al., 2012). Au cours de leur cycle de vie, certaines macroalgues ont un stade microscopique pouvant correspondre à un gamétophyte ou à un sporophyte (cf Chapitre 1). Ces différents stades précoces (SP) sont utilisés par les aquaculteurs pour démarrer certaines cultures. Comme les microalgues, ces SP peuvent être cultivés dans des conditions contrôlées, ne dépendant ainsi plus des paramètres environnementaux extérieurs. Ces SP représentent une biomasse qui n'est que peu valorisée actuellement, notamment ceux d'*Undaria pinnatifida* par BiotechMarine (SEPPIC, France ; <https://www.seppic.com/seppic/biotechmarine>) (Cattuzzato et al., 2018) ou encore ceux d'*Alaria esculenta* et *Jania rubens* par Codif Technologie Naturelle (France, <http://www.codif-tn.com/>), et qui pourrait s'avérer innovante, notamment dans le domaine de la cosmétique.

Ainsi, deux types de biomasses nous ont intéressé dans ce travail de thèse : celle cultivée par la société C-Weed Aquaculture et celle récoltée dans des populations sauvages par des récoltants professionnels. Ce chapitre 3 se structure donc en deux parties : dans la première partie, nous avons étudié les composés phénoliques de SP de 3 espèces de macroalgues brunes (*Alaria esculenta*, *Undaria pinnatifida* et *Ectocarpus siliculosus*) et ainsi testé différentes méthodes pour extraire et purifier ces composés. Nous avons notamment essayé de booster la production de composés phénoliques de ces SP en effectuant une orientation métabolique par stress lumineux. L'objectif de la seconde partie de ce Chapitre 3 a été d'étudier l'existence ou non d'une variation temporelle dans la production de composés phénoliques actifs de 7 macroalgues brunes bretonnes (*Alaria esculenta*, *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata*, *Fucus serratus*, *Halidrys siliquosa*, *Himanthalia elongata* et *Laminaria ochroleuca*) potentiellement exploitables à l'échelle industrielle. Avant de se lancer dans la valorisation de certaines espèces de macroalgues sauvages, il est important et nécessaire de connaître l'impact de l'environnement sur la production de molécules cibles, pour pouvoir ainsi récolter les macroalgues, soit toute l'année, soit à certaines périodes selon les variations observées dans la production des métabolites cibles.

2. Les stades précoces ou stades filamenteux, nouvelles ressources innovantes pour la cosmétique ?

2.1 Généralités

Les macroalgues présentent dans leur cycle de vie des phases microscopiques, qui peut être une spore (haploïde ou diploïde), un zygote diploïde, un gamétophyte filamenteux haploïde ou un sporophyte filamenteux diploïde, qui se fixent sur un substrat et qui s’y développent pour se reproduire par la suite et assurer la pérennité de l’espèce. Pour certaines espèces, il est possible de cultiver ces phases microscopiques, appelées stade précoce (SP), comme des microalgues. Dans cette étude, nous nous sommes intéressées à 3 espèces d’algues brunes cultivées en « free-living » (cf Encart 1, Chapitre 1) par l’entreprise C-Weed Aquaculture pour leur facilité de culture et leur vitesse de croissance : *Alaria esculenta*, *Undaria pinnatifida* et *Ectocarpus siliculosus*. *A. esculenta* et *U. pinnatifida*, deux Laminariales, présentent le même cycle de reproduction, différent cependant de celui d’*E. siliculosus*, une Ectocarpales. En effet, cette dernière est une espèce isomorphe, les stades gamétophyte et sporophyte sont identiques morphologiquement et sont à l’état filamenteux microscopique pendant les deux stades. A l’inverse, les deux Laminariales ont un cycle hétéromorphe, avec un stade gamétophyte à l’état microscopique et un stade sporophyte à l’état macroscopique (Figure 3-1, plus de détails dans le Chapitre 1). Aujourd’hui, les macroalgues sont valorisées dans de nombreux domaines, mais principalement quand elles sont macroscopiques (les grandes algues) et non microscopiques puisque la plupart du temps elles sont récoltées sur l’estran ou cultivées en filière. Ces SP sont intéressants puisqu’ils peuvent contenir des molécules différentes des sporophytes/grandes algues qualitativement et/ou quantitativement. Par exemple, Tasende (2000) a montré que les gamétophytes de la macroalgue rouge *Chondrus crispus* contenaient une teneur en acides gras et en stérols plus élevés que les sporophytes. De plus, des différences de distribution des acides gras entre les deux générations ont été observées avec une plus forte proportion d’acide gras monoinsaturés chez les gamétophytes et d’acide gras saturés et polyinsaturés chez les sporophytes. D’autres molécules sont retrouvées concentrées dans les SP. Ainsi, Clayton & Ashburner (1994) ont mis en évidence la présence de composés phénoliques mais aussi d’alginate en plus grande quantité chez le zygote de l’algue brune *Durvillaea potatorum*. Un autre intérêt de la culture de stades précoces de macroalgues est de pouvoir contrôler les conditions de culture afin d’orienter la production de métabolites d’intérêt, tout comme les microalgues. Cela permet une indépendance face aux conditions environnementales ne dépendant ainsi plus des aléas environnementaux en termes de biomasse disponible et de possibles variations temporelles des métabolites. Pour toutes ces raisons, cette biomasse a donc un intérêt de valorisation puisque la

biomasse est disponible toute l'année et les teneurs en métabolites d'intérêt sont connus et ne varient pas ou peu. L'orientation métabolique correspond à imiter des stress environnementaux induisant cette production particulière. Dans la littérature, l'accumulation de ces composés phénoliques chez *Ecklonia radiata* a été mise en évidence par microscopie à fluorescence après un broutage par des herbivores sur des sporophytes macroscopiques (Lüder & Clayton, 2004) : les composés phénoliques émettent en effet de la fluorescence verte (entre 515 et 565 nm) lorsqu'ils sont soumis à des radiations de longueur d'onde entre 450 et 490 nm. D'autres stress permettant une forte augmentation de la teneur en composés phénoliques existent : une forte exposition aux radiations UV, une augmentation de la salinité ou encore de la température (Pavia et al., 1997 ; Tanniou, 2014) sont des paramètres sur lesquels on peut intervenir pour orienter la synthèse des composés phénoliques chez les algues brunes.

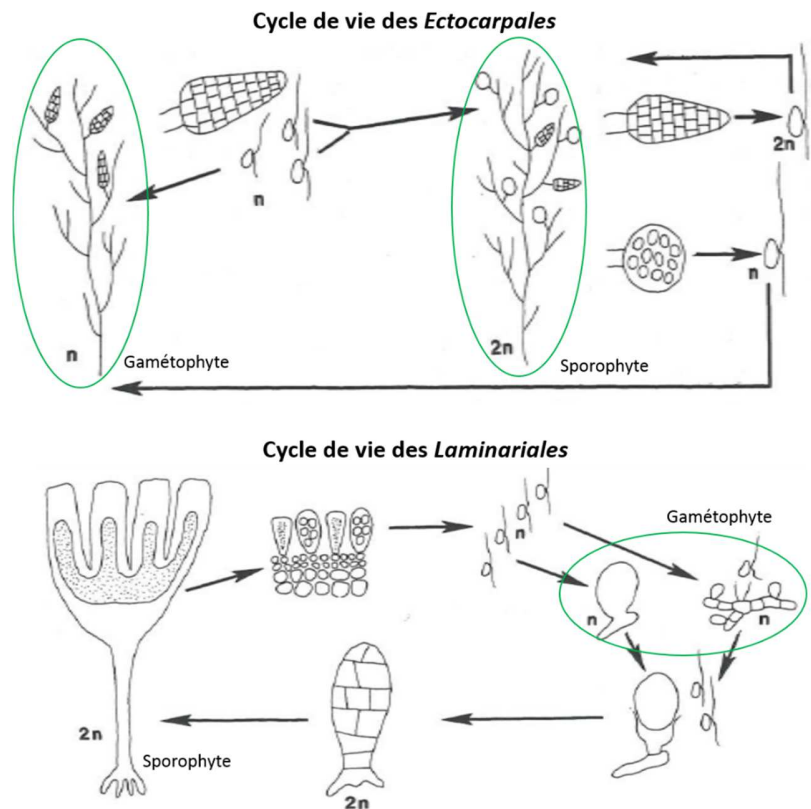


Figure 3-1: Cycles de reproduction des *Ectocarpales* vs *Laminariales* modifiés de Fletcher (2011). Les cercles verts entourent les phases utilisées en culture « free-living » et donc correspondant aux SP.

L'objectif de cette étude est d'obtenir des extraits enrichis en composés phénoliques actifs à partir de SP des 3 espèces et ainsi de tenter de les valoriser dans le domaine de la cosmétique. La première étape a donc été d'observer la présence de ces composés au sein des SP et de les quantifier.

Pour cela, différents conditionnements des SP ont été testés (congélation à -20°C, séchage à l'étuve à 30°C, lyophilisation, sans conditionnement), puis les composés phénoliques ont été extraits (extraction solide/liquide) en testant différents solvants. Ensuite, différentes méthodes de fragmentation des SP ont été expérimentées pour améliorer la récupération du contenu cellulaire des SP. Pour observer l'impact de chaque méthode, des observations au microscope ont été réalisées. Différentes méthodes d'extraction ont aussi été menées dont la macération classique ainsi qu'une méthode d'extraction plus éco-responsable, l'extraction accélérée par solvant (ASE). Enfin, une expérience d'orientation métabolique par une culture sous radiations UV a été menée sur 2 espèces pour tenter d'augmenter leur teneur en composés phénoliques de ces SP. Pour mettre en évidence la présence de composés phénoliques, le test du Folin-Ciocalteu a été mené sur les extraits et une technique d'observation *in situ* des composés phénoliques par microscopie à épifluorescence a été utilisée.

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Les stades précoces (SP)

Les stades précoces (SP) ont été fournis par l'entreprise C-Weed Aquaculture et réceptionnés en suspension dans leur milieu de culture. Trois espèces ont donc été étudiées : *Alaria esculenta*, *Undaria pinnatifida* et *Ectocarpus siliculosus* (Figure 3-2).

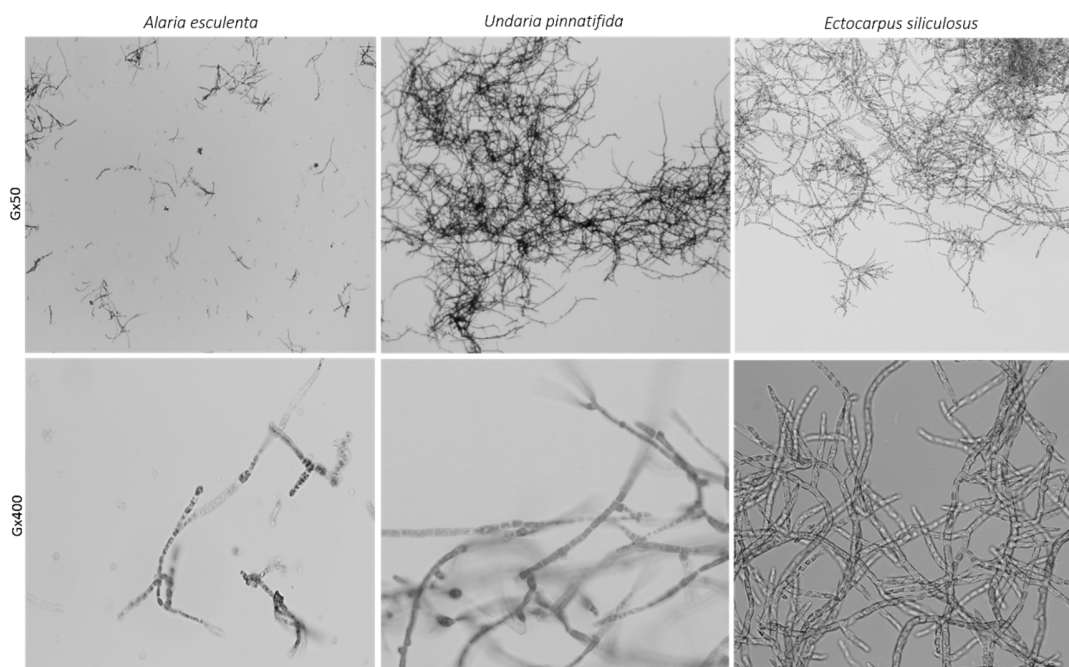


Figure 3-2 : Photographies prises au microscope optique des 3 stades précoces d'*Alaria esculenta*, *Undaria pinnatifida* et *Ectocarpus siliculosus* obtenues au grossissement 50 et 400.

2.2.2 Analyse des composés phénoliques et des activités antioxydantes associées

2.2.2.1 Quantification des composés phénoliques

La teneur en CP est déterminée spectroscopiquement par le test du Folin-Ciocalteu (Zubia et al., 2009 ; Surget et al., 2015). Les puits de microplaques ont été remplis par 20 μL d'extrait/fraction, 130 μL d'eau distillée, 10 μL du réactif et 40 μL de Na_2CO_3 (200 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Le mélange a été incubé pendant 10 min à 70°C. Ensuite, la microplaque a été placée dans de la glace pour stopper la réaction chimique et l'absorbance a été effectuée à 620 nm (Mutiskan™ FC, Thermo Scientific™, Etats-Unis). La teneur en CP a été exprimée en mg par g d'extrait sec ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ d'extrait) à partir d'une gamme étalon de phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene). Les analyses ont été effectuées en triplicat pour chaque extrait.

2.2.2.2 Détermination des activités biologiques

- Activité anti-radicalaire par le test du DPPH

Le test anti-radicalaire du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) modifié selon [Zubia et al. \(2009\)](#) a été mis en place pour déterminer l'activité anti-radicalaire des extraits/fractions. Pour cette méthode, 22 µL d'extrait/fraction/contrôle ont été ajoutés à 200 µL de solution de DPPH (25 mg.L⁻¹) préparée dans les 24 h. Après 60 min à l'obscurité à température ambiante, l'absorbance a été lue à 540 nm. L'eau distillée a été utilisée comme contrôle négatif et l'acide ascorbique (vitamine C), l'α-tocophérol (vitamine E) et le 2,3-t-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) et le 2,6-di-ter-butyl-4-méthylphénol (BHT) comme contrôles positifs. L'activité anti-radicalaire des extraits/fractions a été exprimée en IC50 (mg.mL⁻¹), concentration de l'échantillon qui entraîne une diminution de 50% de l'activité du DPPH. Plus l'IC50 est faible, plus l'activité antioxydante est forte. Les analyses ont été effectuées en triplicat pour chaque extrait.

- Activité du pouvoir réducteur du fer avec le test du FRAP

L'activité réductrice a été évaluée par une réaction d'oxydoréduction entre les composés phénoliques de l'extrait/fraction et les ions métalliques de transition comme les ions ferriques. La méthode utilisée est celle de [Zubia et al. \(2009\)](#). Dans une microplaque, 25 µL de tampon de phosphate de sodium (0,2 mM, pH 6,6) et 25 µL de potassium ferricyanide à 1% ont été ajoutés à 25 µL d'extrait/fraction/contrôle. Après homogénéisation, les microplaques ont été incubées à 50°C pendant 20 min. La réaction a ensuite été stoppée dans la glace. Une première mesure de l'absorbance a été effectuée à 620 nm après l'addition de 25 µL d'acide trichloroacétique et 100 µL d'eau distillée. Finalement, 20 µL de chlorure de fer ont été ajoutés. Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 620 nm. La vitamine C et le BHA ont été utilisés comme contrôle positif. Le pouvoir réducteur a été exprimé en EC50 (mg.mL⁻¹) après le calcul du pourcentage d'inhibition par comparaison avec le blanc (eau distillée). Plus l'EC50 est faible, plus le pouvoir antioxydant est fort. Les analyses ont été effectuées en triplicat pour chaque extrait.

- Activité photoprotectrice (par Laurence Coiffard et Céline Couteau de l'Université de Nantes)

La méthode utilisée est décrite par [Couteau et al. \(2007 ; 2018\)](#). Brièvement, l'extrait est incorporé dans une émulsion huile-dans-eau et 50 mg ont été étalés avec le bout du doigt sur une plaque en polyméthylméthacrylate (PMMA). Puis, des mesures de transmission ont été effectuées sur 9 répliquats à l'aide d'un spectrophotomètre entre 290 et 400 nm (UV transmittance Analyze UV1000S, Labsphere, USA).

$$SPF = \frac{\sum_{290}^{400} E_{\lambda} I_{\lambda} \Delta_{\lambda}}{\sum_{290}^{400} E_{\lambda} I_{\lambda} \Delta_{\lambda}}$$

Avec E_{λ} l'irradiance spectrale de la lumière terrestre à λ , I_{λ} est le spectre d'action érythémal à λ et Δ_{λ} est la transmittance spectrale de l'échantillon à λ . L'activité photoprotectrice SPF (facteur de protection solaire) a été calculée entre 290 et 400 nm et l'activité photoprotectrice FP-UVA (facteur de protection UVA) a été calculée entre 320 et 400 nm.

2.2.3 Extraction par macération solide/liquide à partir de différents conditionnements

Des extractions solide/liquide type macération ont été testées sur les SP d'*Undaria pinnatifida* sur des algues fraîches (F), congelées à -20°C (C), séchées à 30°C (S) et lyophilisées (L) (Figure 3-3). Dans un premier temps, les SP ont été filtrées à l'aide d'une passoire. Ensuite, 4 g d'algues (F, C, S ou L) ont été extraits par une macération avec différents solvants à la suite : eau, éthanol, acétone, mélange dichlorométhane/méthanol (2:1). Pour chaque solvant, la macération a duré 2 h sous agitation à l'obscurité à 40°C sauf pour le mélange dichlorométhane/méthanol qui a été effectué à température ambiante (Bain à agitation thermostatée, Julabo GmbH SW22, Allemagne). Puis, l'extrait obtenu a été filtré et le culot repris avec 40 mL de solvant pour relancer une nouvelle macération cette fois-ci d'1 h.

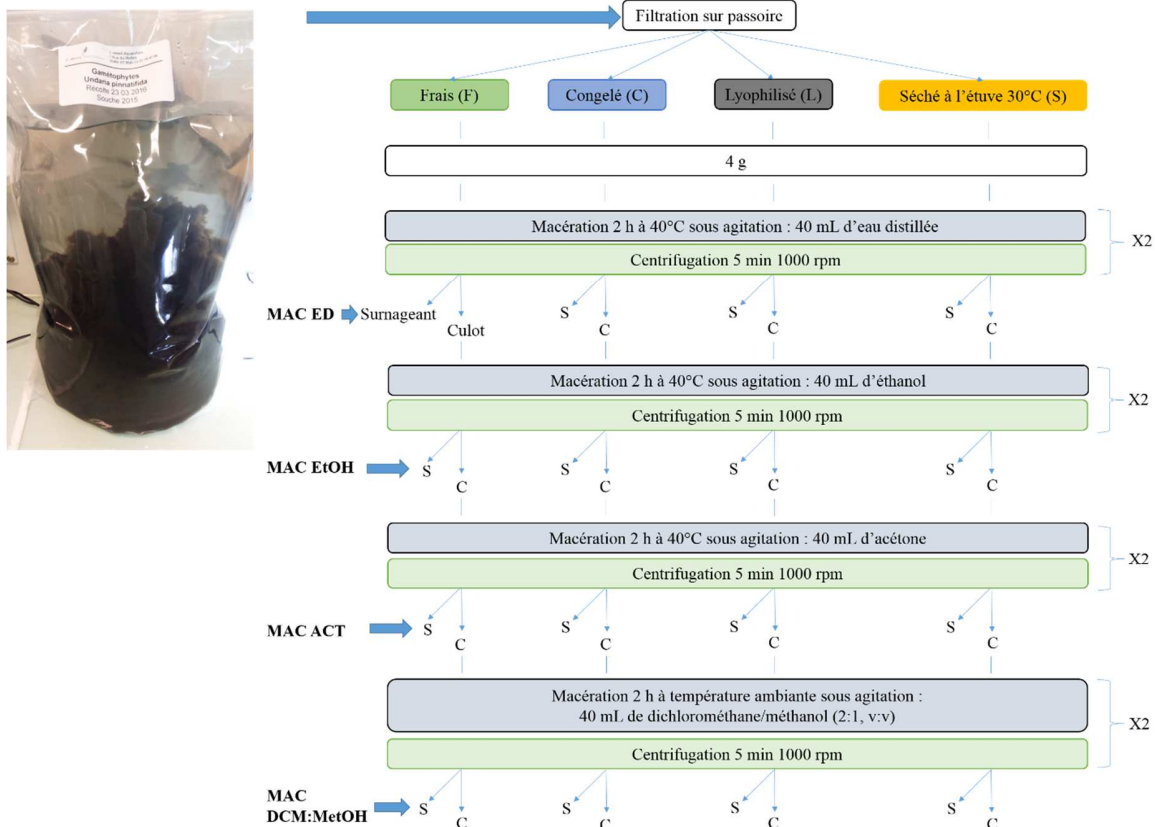


Figure 3-3: Protocole de l'extraction solide/liquide en cascade menée sur des stades précoces (SP) d'*Undaria pinnatifida* conditionnées dans 4 états différents : frais, congelé, lyophilisé ou séché à l'étuve à 30°C .

A la fin des extractions, 80 mL d'extrait brut (regroupement des deux surnageants) ont donc été obtenus pour chaque lot 'conditionnement' (F, C, L et S, [Figure 3-3](#)). Ces extractions ont été réalisées en triplicats. L'extrait à l'eau a été congelé directement et lyophilisé. Les autres extraits ont été évaporés (Evaporateur rotatif, Laborota 4000 efficient, Heidolph, Allemagne), repris dans de l'eau, congelés et lyophilisés (Lyophilisateur, Beta 1-8 LD, Christ, Allemagne).

2.2.4 Comparaison de différentes méthodes de fragmentation et d'extraction

Plusieurs techniques de fragmentation des SP ont été expérimentées pour tenter de vider le contenu cellulaire et ainsi, libérer les molécules d'intérêt : les ultrasons par bain (US1 ; Sonicateur 88155, 85W, 35 kHz, Bioblock Scientific, France) ou par sonde (US2 ; Sonicator Ultrasonic Processor, 20 kHz, 2000W, Etats-Unis), les micro-ondes (μ O ; Micro-ondes Samsung TDS M1714, Corée du Sud) et le cryobroyage (CRYO) ([Figure 3-4](#)). Le cryobroyage a été réalisé simplement en broyant 1 g de SP avec de l'azote liquide dans un mortier, posé dans de la glace. Des extractions solide/liquide par macération à l'eau ou à l'éthanol (MACED ou MACEtOH ; Bain-marie Julabo GmbH SW22, Allemagne) seule ou couplée aux procédés de fragmentation ont également été menées. Une autre technique d'extraction, plus éco-responsable, a également été effectuée : l'extraction accélérée par solvant, appelée ASE (Dionex™ ASE™ 150, Etats-Unis ; cf. Chapitre 2, page 102). Toutes ces expériences ont été testées sur les SP d'*Undaria pinnatifida*. Des essais de cryobroyage et ultrasons par sonde ont également été menés sur les gamétophytes d'*Alaria esculenta*. Enfin, toutes les expérimentations ont été menées sur des SP congelés (cf. page 191) sauf pour l'ASE (SP lyophilisées). La quantification de la teneur en composés phénoliques a été réalisée par le test du Folin-Ciocalteu sur certains extraits ([Figure 3-4](#)) et l'activité anti-radicalaire mesurée par le test du DPPH ([Figure 3-4](#)). Enfin, des images au microscope optique (Zeiss Lab.A1) ont été effectuées pour permettre d'observer si les SP étaient fragmentées par les différentes méthodes de fragmentation testées.

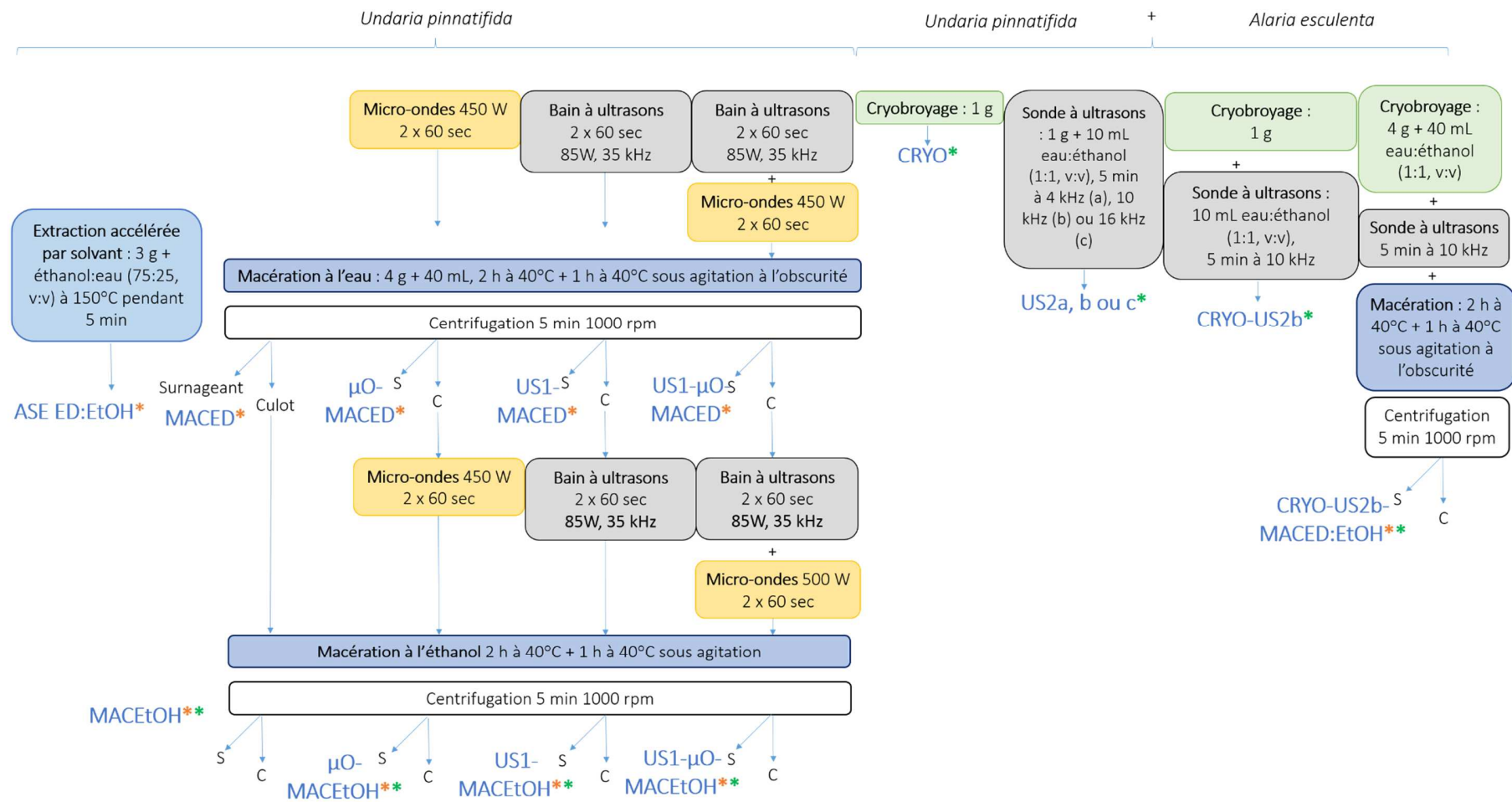


Figure 3-4 : Différentes méthodes de fragmentation et d'extraction testées sur les stades précoces (SP) d'*Undaria pinnatifida* et d'*Alaria esculenta* et les analyses effectuées sur les extraits obtenus (notés en bleu) représentées par les étoiles : l'étoile orange correspond au dosage des composés phénoliques par le test du Folin-Ciocalteu et la mesure de l'activité antioxydante par le test du DPPH, l'étoile verte correspond à une observation au microscope optique.

2.2.5 Orientation métabolique

2.2.5.1 Culture des stades précoces (SP)

Les SP d'*U. pinnatifida* et d'*E. siliculosus* fournis dans leur milieu de culture ont été placés dans des bacs de culture en salle thermostatée à 13°C dans de l'eau de mer filtrée à 0,2 µm avec du bullage, contenant du milieu de culture Provasoli modifié d'après [Starr & Zeikus \(1993\)](#) (10 mL par L d'eau de mer) et autoclavé (Figure 3-5).

Solution 1 (500 mL)

Produit	Masse (g)	Remarques
H ₃ BO ₃	0.57	Chauffer doucement pour dissoudre
FeCl ₃	0.015	
MnSO ₄ (H ₂ O)	0.082	
ZnSO ₄ (7 H ₂ O)	0.011	
CoCl ₂ (6 H ₂ O)	0.017	
EDTA	0.5	Se dissout à partir de pH 8

Compléter à 500 mL avec de l'eau distillée

Solution 3 (400 mL)

Produit	Masse (g)	Remarques
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ (6 H ₂ O)	0.351	Bien diluer
EDTA	0.3	Se dissout à pH 8

Compléter à 400 mL avec de l'eau distillée

Solution 2 (500 mL)

Produit	Masse (g)
Vitamine B12	0.0002
Thiamine	0.01
Biotine	0.0001
TRIS	10

Compléter à 500 mL avec de l'eau distillée

500 mL Solution 1
 + 500 mL Solution 2
 + 400 mL Solution 3
 + 7 g NaNO₃
 + 1 g C₃H₇Na₂O₆P (5 H₂O)

 pH ajusté à 7.8 avec HCl à 37%

 Volume ajusté à 3 L,
 autoclavé, conservé à 4°C

Figure 3-5 : Les différentes étapes pour obtenir le milieu Provasoli, modifié d'après [Starr & Zeikus \(1993\)](#).

Pour chaque condition, chaque espèce était disposée dans des bacs différents. Ces SP ont été cultivés pendant 3 semaines en bassin avec une photopériode de 16 h (jour) et 8 h (nuit). Deux conditions de culture ont été menées : une première condition avec un spectre lumineux correspondant à la lumière visible c'est-à-dire à des longueurs d'onde supérieures à 400 nm, et une deuxième condition avec un spectre

lumineux correspondant aussi à la lumière visible mais avec en plus les UV-A dont les longueurs d'onde sont comprises entre 320 et 400 nm (Figure 3-6).

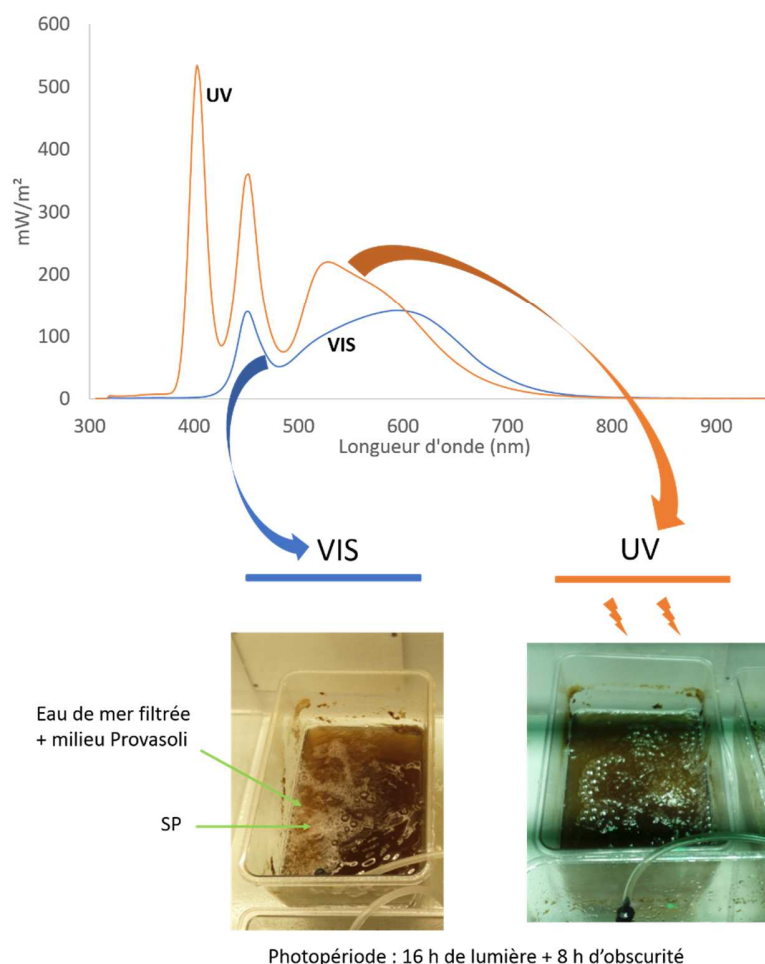


Figure 3-6: Expérience d'orientation métabolique en plaçant des stades précoces (SP) dans des bacs ayant deux conditions de culture différentes c'est-à-dire exposés à différentes qualités de lumière : une condition exposée à la lumière visible avec des longueurs d'onde supérieures à 400 nm (VIS), une autre condition exposée aux radiations UVA (entre 320 et 400 nm) + lumière visible (UV).

2.2.5.2 Cryobroyage, ultrasons et macération (CRYO-US2-MAC)

Trois répliquats de 45 mL de SP ont été prélevés au lancement de la culture (à T0) ainsi qu'au bout de 3 semaines (T3). Un cryobroyage suivi d'ultrasons, ainsi qu'une macération avec un mélange eau/éthanol ont été effectués (CRYO-US2b-MACED:EtOH, cf Figure 3-4). La teneur en CP des extraits obtenus après cryobroyage, ultrasons et macération (CRYO-US2b-MACED:EtOH) à T0 et T3 a été quantifiée par le test du Folin-Ciocalteu. L'activité anti-radicalaire ainsi que l'activité photoprotectrice ont été évaluées sur les

extraits obtenus après CRYO-US2-MAC à T0 et T3 par le test du DPPH et le facteur de protection solaire (SPF) respectivement.

2.2.5.3 *Suivi des composés phénoliques par microscopie à épifluorescence*

Des images par microscopie à épifluorescence (Zeiss Axio Observer Z1 couplé au module Vivatome 3D®, Allemagne) ont été prises dans le but d'observer et localiser les composés phénoliques dans les SP. La longueur d'excitation utilisée était de 494 ± 20 nm et la longueur d'émission était de 536 ± 40 nm en s'inspirant des travaux de Lüder & Clayton (2004). Les analyses ont été effectuées sur les cultures d'*E. siliculosus* et d'*U. pinnatifida* au bout d'1 (T1) et 3 semaines (T3) pour les deux cultures différentes, avec et sans UV.

2.2.6 Tests statistiques

Le logiciel R pour Windows a été utilisé, avec l'environnement de développement intégré RStudio (v 1.2.1335). Les résultats sont donnés en termes de moyenne \pm écart-type. L'homogénéité des variances a été testée avec le test de Bartlett avec un risque d'erreur de 5%. Quand l'homogénéité des variances était respectée, le test d'ANOVA à un facteur a été utilisé. Quand l'homogénéité des variances n'était pas respectée, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été appliqué avec un niveau de significativité de 95%. Quand des différences significatives apparaissaient, des comparaisons étaient possibles grâce au test post-hoc Tukey après l'ANOVA et au test Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR) après le test Kruskal-Wallis.

2.3 Résultats

2.3.1 Obtention d'extraits par macération à partir de différents conditionnements

2.3.1.1 Teneurs en composés phénoliques (TCP)

Les TCP sont significativement plus élevées dans l'extrait éthanolique comparativement aux extraits aqueux et acétonique (Kruskal-Wallis, $p < 0.001$) (Figure 3-7). Des composés ont été détectés dans la fraction acétonique seulement pour l'extrait congelé et pas dans les autres conditionnements. Aucune TCP n'a été détectée dans les extraits dichlorométhane/méthanol quelque soit le conditionnement. Dans la fraction éthanolique, la TCP la plus élevée a été obtenue lorsque les SP étaient congelées comparativement aux SP fraîches (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0.007$), lyophilisées (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p < 0.001$) ou séchées à l'étuve (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0.013$). Dans la fraction aqueuse, les 4 conditionnements sont significativement différents en termes de TCP (ANOVA à un facteur, $p < 0.001$). C'est lorsque les SP ont été lyophilisés que la TCP est plus forte, suivi de près par les SP congelés mais qui possèdent une teneur significativement différente (ANOVA à un facteur, Tukey, $p = 0,011$).

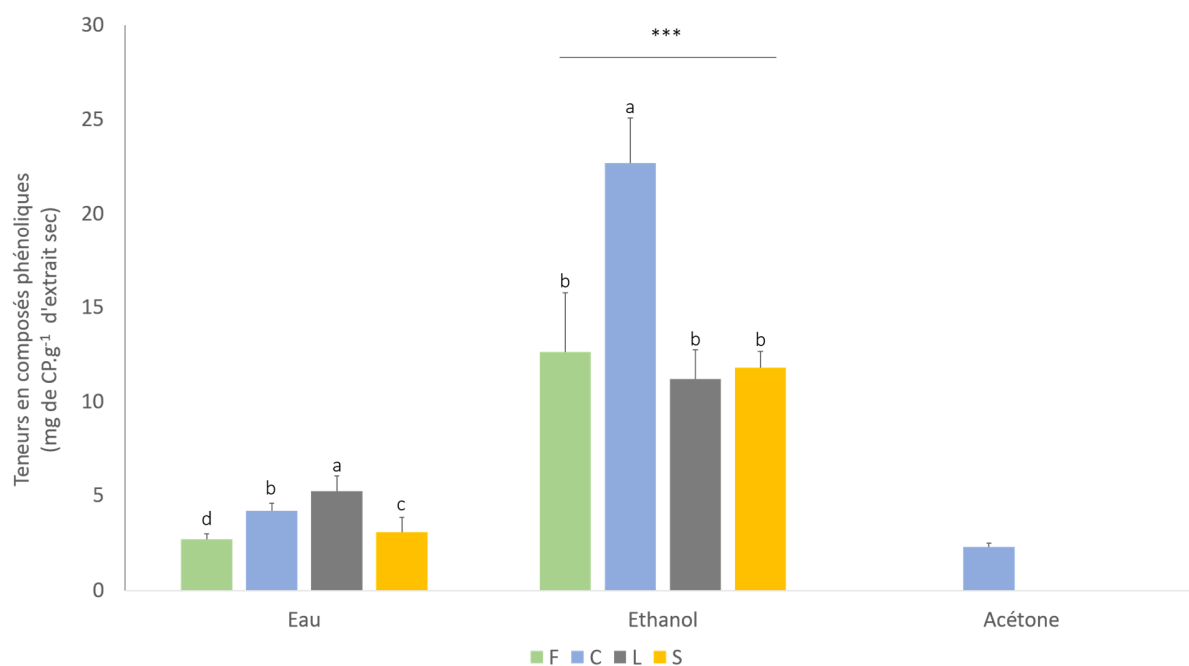


Figure 3-7: Teneurs en composés phénoliques (TCP) des extraits d'*Undaria pinnatifida* obtenus après macération à l'eau puis à l'éthanol puis à l'acétone sur des stades précoces (SP) frais (F), congelés (C), lyophilisés (L) ou séchés à l'étuve à 30°C (S). Les lettres indiquent une différence significative entre les fractions à l'eau (ANOVA à un facteur, $p < 0,001$) et entre les fractions éthanoliques (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$, $n=3$). Les étoiles indiquent une différence significative entre les 3 solvants (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$, $n=3$).

2.3.1.2 Activités antioxydantes

Seules les fractions éthanoliques ont montré des activités antioxydantes pour les deux tests, aucune de ces activités n'a été retrouvée pour les extraits à l'eau, à l'acétone ou au dichlorométhane:méthanol. Les fractions éthanoliques, les plus riches en composés phénoliques, présentent donc les activités antioxydantes les plus élevées. L'activité anti-radicalaire des extraits lyophilisés et congelés n'a pas montré de différence significative avec 3 témoins positifs (BHA, vitamines E et C) et sont donc similaires (Figure 3-8). Concernant, les extraits frais et séché, leur activité antioxydante est similaire au BHT mais moins importante significativement que le BHA et les vitamines C et E (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Concernant le test du FRAP, les fractions éthanoliques présentent également une activité, cependant très faible par rapport aux contrôles positifs, vitamine C et BHA (Tableau 3-1). Les tests statistiques peuvent étonner en ne trouvant pas de différence significative, cela est dû aux faibles nombres d'échantillons.

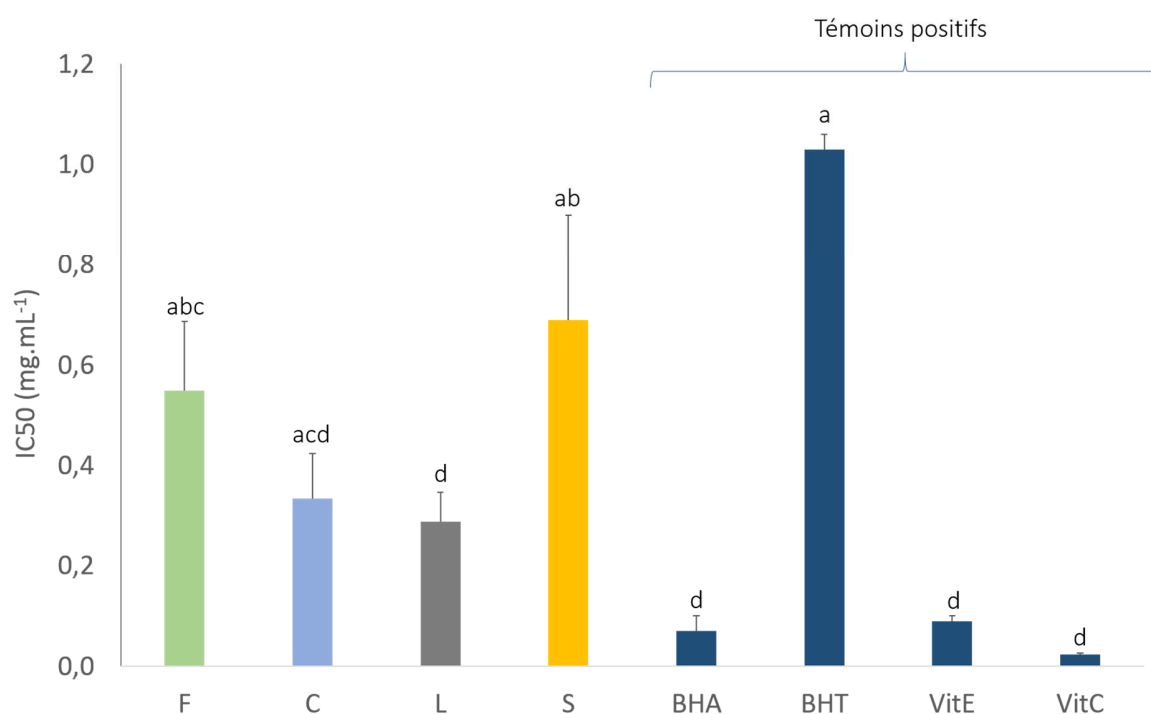


Figure 3-8: Activité anti-radicalaire d'après le test du DPPH des extraits d'*Undaria pinnatifida* obtenus après macération à l'éthanol sur des stades précoces (SP) fraîches (F), congelées (C), lyophilisées (L) ou séchées à l'étuve à 30°C (S). Les lettres indiquent une différence significative entre les extraits et témoins positifs (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$, $n=3$).

Tableau 3-1 : Activité antioxydante d'après le test du pouvoir réducteur du fer (FRAP) des extraits d'*Undaria pinnatifida* obtenus après macération à l'éthanol sur des stades précoces (SP) frais (F), congelés (C), lyophilisés (L) ou séchés à l'étuve à 30°C (S). Les lettres indiquent une différence significative entre les extraits et témoins positifs (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$, $n=3$).

Extrait	EC50 (mg.mL ⁻¹)
F	7,28 ± 1,82 ^{ab}
C	9,09 ± 1,44 ^a
L	9,82 ± 1,72 ^a
S	7,63 ± 0,33 ^{ab}
BHA	0,08 ± 0,002 ^c
VitC	0,12 ± 0,003 ^c

2.3.2 Comparaison de différentes méthodes de fragmentation et d'extraction

2.3.2.1 Suivi de la fragmentation par microscopie

Il est plus facile d'observer la fragmentation des SP d'*U. pinnatifida* qui sont longs comparativement à ceux d'*Alaria esculenta* comme le montre la Figure 3-1. Les deux premières figures montrent les différentes techniques de fragmentation sur les SP d'*U. pinnatifida* (Figures 3-9, 3-10) tandis que la troisième figure montre les techniques de fragmentation sur les SP d'*A. esculenta* (Figure 3-11). Pour les SP d'*U. pinnatifida*, la macération à l'éthanol (MACEtOH) ainsi que les micro-ondes couplées à la macération (μ O-MACEtOH) n'ont pas montré de fragmentation des SP à l'inverse de la technique des ultrasons par bain couplés à la macération (US1-MACEtOH) et ultrasons couplés aux micro-ondes puis à la macération (US1- μ O-MACEtOH) (Figure 3-9). Cependant, même si une fragmentation des SP est remarquée pour ces deux méthodes, elle est beaucoup moins efficace que le cryobroyage, les ultrasons avec la sonde ou l'assemblage de ces deux méthodes (Figure 3-10). En effet, un grand nombre de débris cellulaires sans contenu cytoplasmique est observé pour ces techniques, et davantage pour le cryobroyage (CRYO), le cryobroyage couplé aux ultrasons (CRYO-US2b) et le cryobroyage couplé aux ultrasons et à la macération (CRYO-US2b-MACED:EtOH).

Concernant les SP d'*Alaria esculenta*, les résultats sont identiques à ceux obtenus pour les SP d'*U. pinnatifida* concernant les techniques de cryobroyage, ultrasons avec la sonde et leur couplage (Figure 3-11). En effet, nous pouvons observer des ruptures au niveau des parois, déversant le contenu cellulaire.

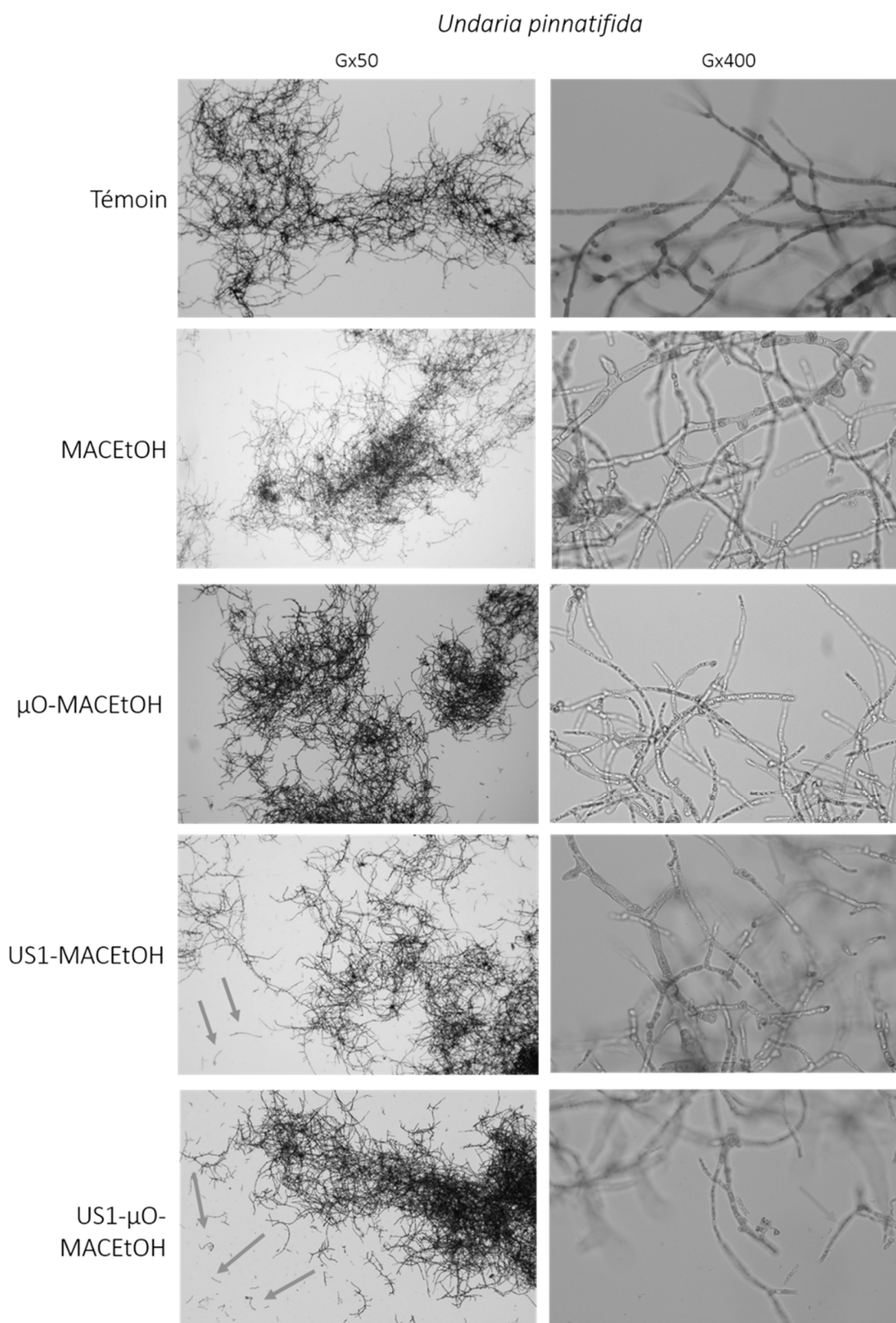


Figure 3-9 : Photographies prises en microscopie électronique des stades précoces (SP) d'*U. pinnatifida* après avoir subies différentes méthodes de fragmentation et d'extraction décrites dans la Figure 3-4. Grossissement du microscope à x50 pour les photos de gauche et à x400 pour les photos de droite. Les flèches désignent les fragmentations des SP et les débris cellulaires vidés de leur contenu.

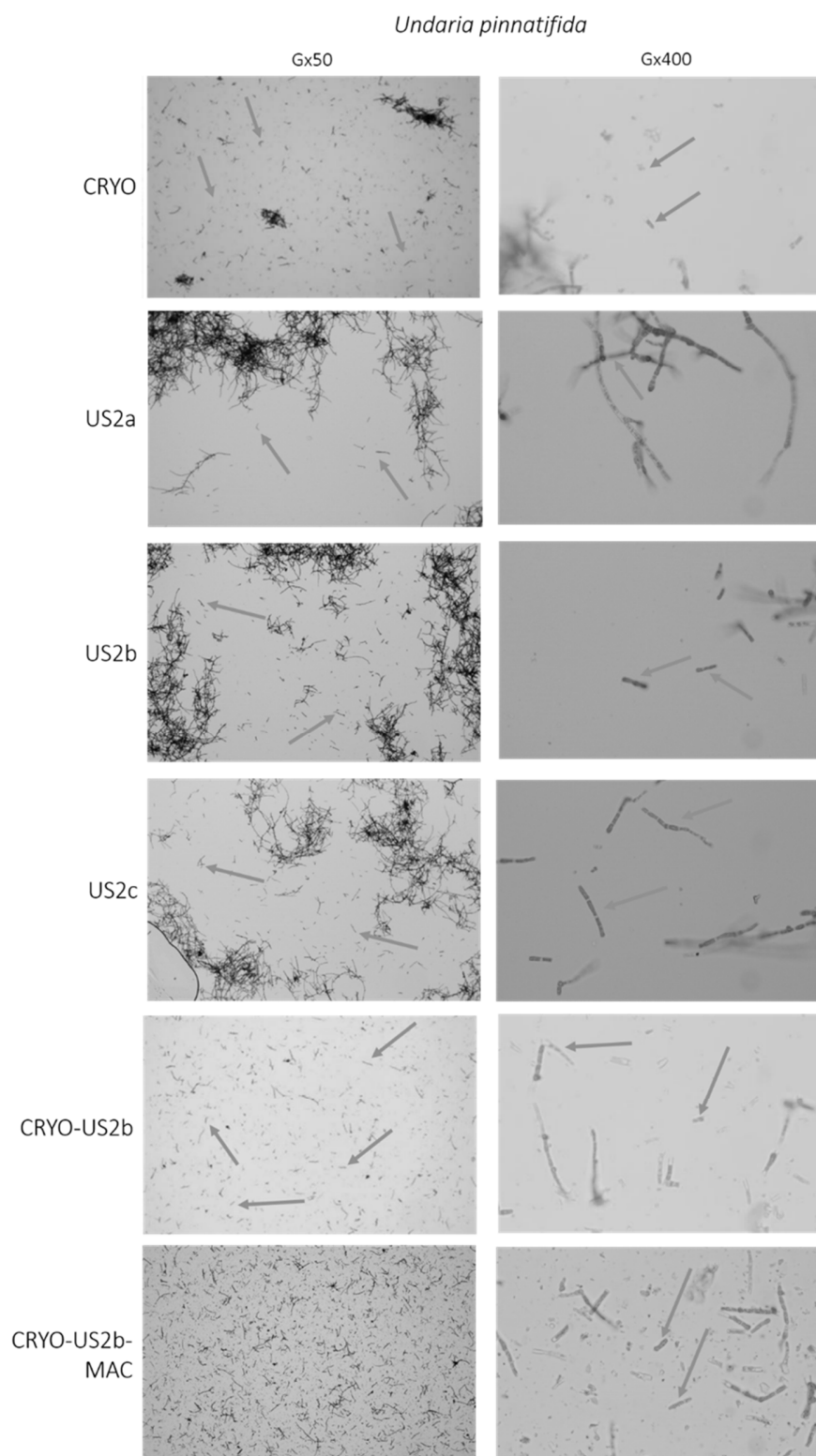


Figure 3-10: Photographies prises en microscopie électronique des CSP d'*Undaria pinnatifida* après avoir subi différentes méthodes de fragmentation et d'extraction décrites dans la Figure 3-4. Grossissement du microscope à 50 pour les photos de gauche et à 400 pour les photos de droite. Les flèches désignent les fragmentations des SP et les débris cellulaires vidés de leur contenu.

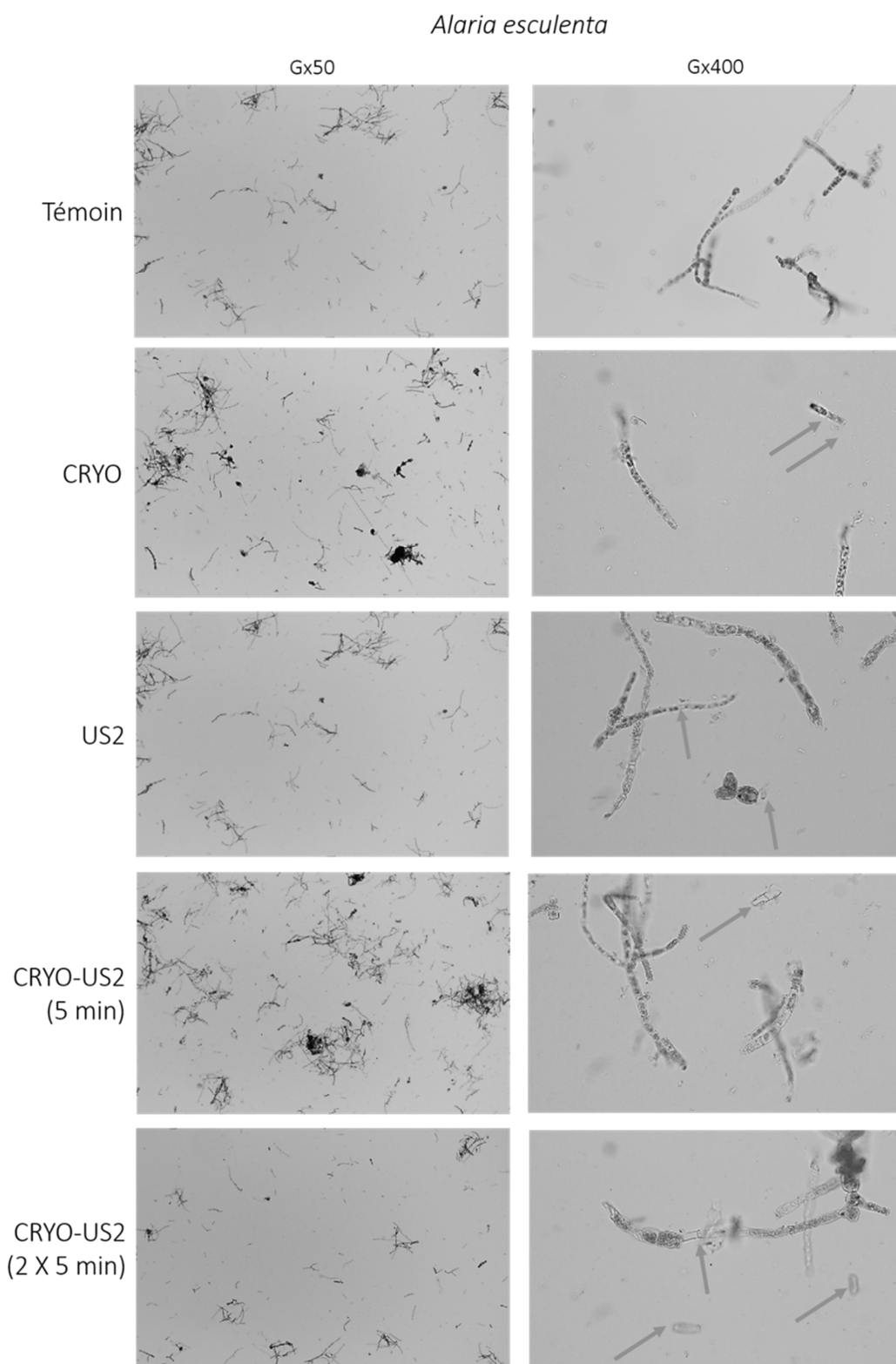


Figure 3-11 : Photographies prises en microscopie électronique des stades précoces (SP) d'*Alaria esculenta* après avoir subi différentes méthodes de fragmentation et d'extraction décrites dans la Figure 3-4. Grossissement du microscope à 50 pour les photos de gauche et à 400 pour les photos de droite. Les flèches désignent les fragmentations des SP et les débris cellulaires vidés de leur contenu.

2.3.2.2 Teneurs en composés phénoliques

Les extractions à l'éthanol ont présenté les teneurs en CP les plus élevées en comparaison des extractions à l'eau (Figure 3-12). C'est la macération seule à l'éthanol qui s'avère extraire le plus de composés phénoliques avec une teneur de 91,1 mg.g⁻¹ d'extrait sec. Cependant, cette TCP n'est pas différente significativement des TCP des extraits obtenus aussi avec macération à l'éthanol mais avec des techniques de fragmentation en plus comme les micro-ondes (μO-MACEtOH), les ultrasons en bain (US1-MACEtOH) et l'association des micro-ondes aux ultrasons (US1-μO-MACEtOH) (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p < 0,001$). Étonnamment, la TCP de l'extrait obtenu par macération à l'eau:éthanol (1:1, v:v) précédée d'un cryobroyage et d'ultrasons par sonde (CRYO-US2b-MACED:EtOH) est plus faible que les méthodes citées précédemment. Les techniques de fragmentation suivies de la macération sur les SP d'*U. pinnatifida* ne permettent pas d'obtenir une teneur en CP plus importante comparativement à une macération seule. D'autre part, la méthode d'extraction alternative à la macération, l'ASE, ne montre également pas une teneur plus forte que la macération classique à l'éthanol (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,468$). La TCP a également été quantifiée pour les CSP d'*A. esculenta* avec la technique du cryobroyage couplée aux ultrasons avec la sonde et la macération ED:EtOH (CRYO-US2b-MACED:EtOH).

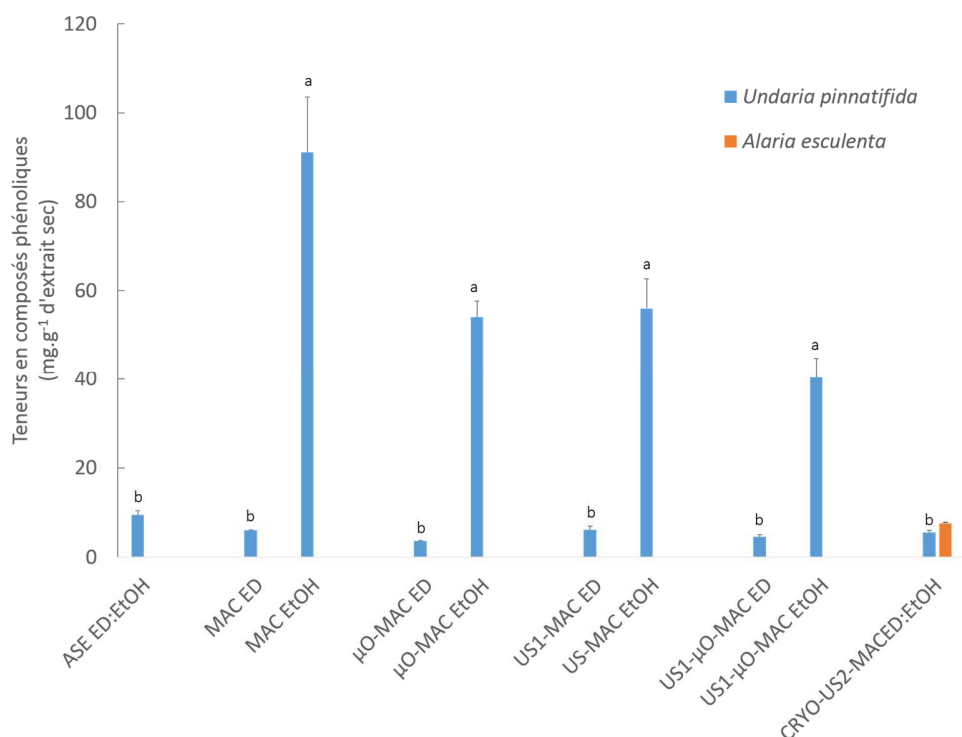


Figure 3-12 : Teneurs en composés phénoliques des extraits de stades précoces (SP) d'*U. pinnatifida* (en bleu) et d'*A. esculenta* (en orange) après différentes techniques de fragmentation et d'extraction (voir détails de la codification des techniques de fragmentation Figure 3-4). Les lettres indiquent une différence significative entre les extraits pour *U. pinnatifida* (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$, $n = 3$).

La teneur est légèrement plus importante à celle obtenue pour *U. pinnatifida* avec 7,6 et 5,4 mg.g⁻¹ d'extrait sec pour *A. esculenta* et *U. pinnatifida* respectivement. Par ailleurs, la teneur en CP de l'extrait ASE n'est pas significativement différente des extraits obtenus par macération à l'eau avec ou sans méthode de pré-fragmentation. Elle n'est également pas différente de la macération eau:éthanol (50 :50, v:v) précédé d'ultrasons et de cryobroyage mais plus faible que la macération à l'éthanol.

2.3.3 Orientation métabolique

2.3.3.1 Observation des composés phénoliques par microscopie à épifluorescence

Des photographies en microscopie à épifluorescence ont été réalisées sur les SP d'*E. siliculosus* et *U. pinnatifida* pour tenter d'observer et localiser les composés phénoliques au niveau du thalle à T1 et T3 (Figure 3-13). Nous détectons les composés phénoliques grâce à la fluorescence verte. Nous n'avons pas observé de différence de fluorescence entre le lot témoin et le lot stressé exposé aux UV.

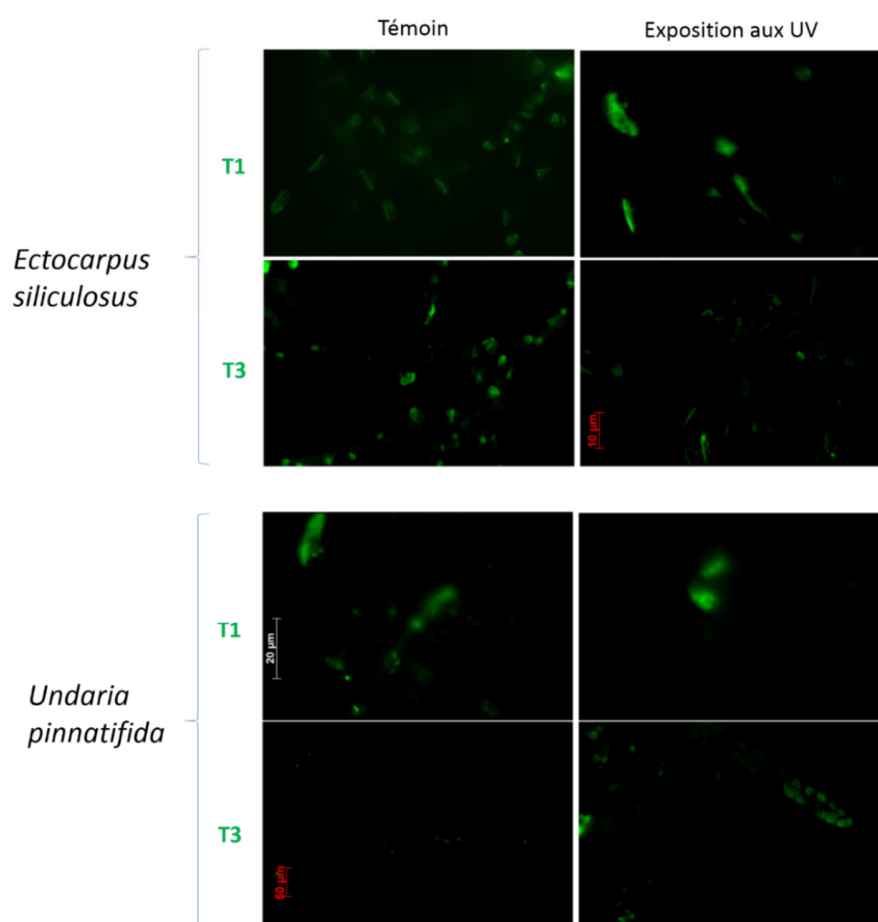


Figure 3-13 : Photographies prises au microscope à épifluorescence des stades précoces (SP) d'*Ectocarpus siliculosus* et d'*Undaria pinnatifida* après 1 semaine (T1) et 3 semaines de culture (T3) sans UV (à gauche) et avec UV (à droite). Les échelles n'ont pas été indiquées sur toutes les photographies.

2.3.3.2 Teneurs en composés phénoliques

A T0, l'extrait de SP d'*U. pinnatifida* présente une TCP plus importante que l'extrait de SP d'*E. siliculosus*, 5,6 et 2,5 mg.g⁻¹ respectivement (Figure 3-14). Concernant les SP d'*E. siliculosus*, aucune différence significative est observée entre le début de la culture (T0) et au bout de 3 semaines sans UV (T3 VIS) (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,691$). Cependant, après 3 semaines de culture sous UV, la TCP est significativement inférieure à celles de T0 et T3 VIS (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,044$ et $p = 0,029$ respectivement). Une autre tendance est observée pour l'extrait de SP d'*U. pinnatifida* : la TCP diminue entre T0 et T3 VIS et à l'inverse de la première espèce, la TCP est plus élevée au bout de 3 semaines sous UV comparativement à la culture sans UV avec 6,622 et 3,817 mg.g⁻¹ respectivement. Cependant, aucune différence significative n'est observée entre les 3 teneurs (ANOVA à un facteur, $p = 0,068$).

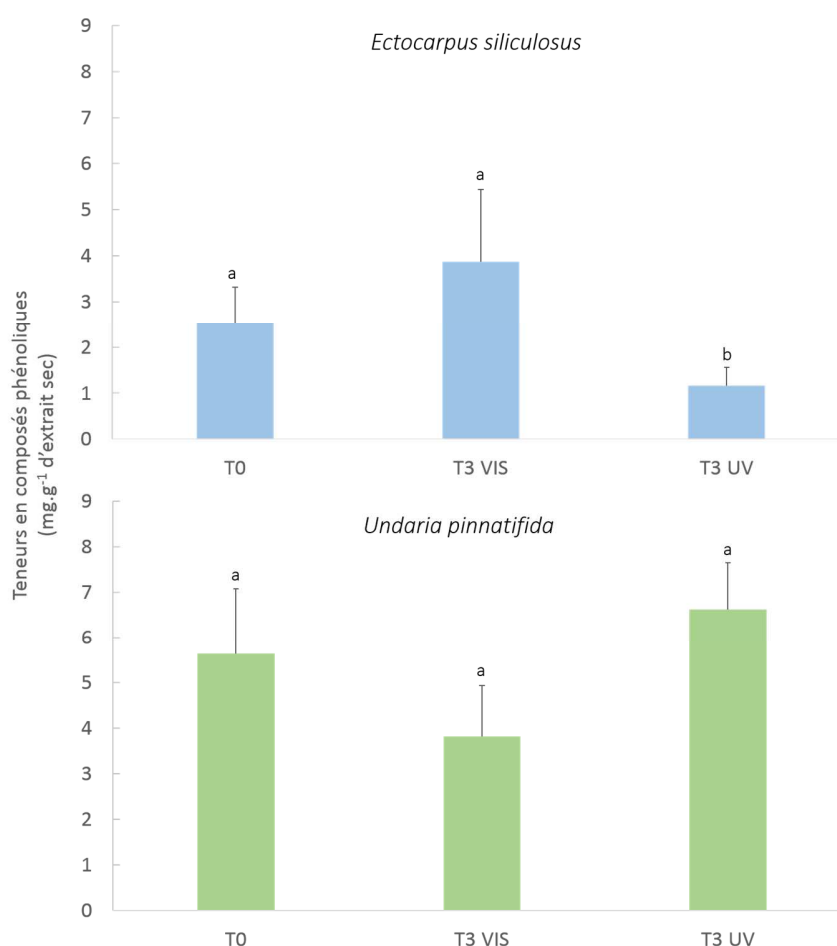


Figure 3-14 : Teneurs en composés phénoliques (TCP) quantifiées par le test du Folin-Ciocalteu des extraits d'*E. siliculosus* (en haut) et d'*U. pinnatifida* (en bas) obtenus après la combinaison de cryobroyage, ultrasons et macération. Ces extraits ont été obtenus après 3 semaines de culture sous forte exposition aux UV (T3 UV) ou non (T3 VIS) et au départ de la culture (T0). Les lettres indiquent une différence significative entre les extraits (Kruskal-Wallis, $p = 0,024$ pour *E. siliculosus* ; ANOVA à un facteur, $p = 0,068$ pour *U. pinnatifida*).

2.3.3.3 Activité anti-radicalaire

L'activité anti-radicalaire a également été mesurée lors de cette orientation métabolique (Figure 3-15). Le BHT est seulement représenté car les autres témoins positifs (BHA et vitamines C et E) présentaient des IC50 beaucoup plus faibles : cela montre que les activités des extraits ne sont pas similaires aux témoins positifs mise à part le BHT avec l'activité de l'extrait d'*E. siliculosus* à T0 (Kruskal-Wallis, PMCMR, $p = 0,012$). Pour les deux algues, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le début de l'expérience et au bout de 3 semaines de culture avec ou sans UV.

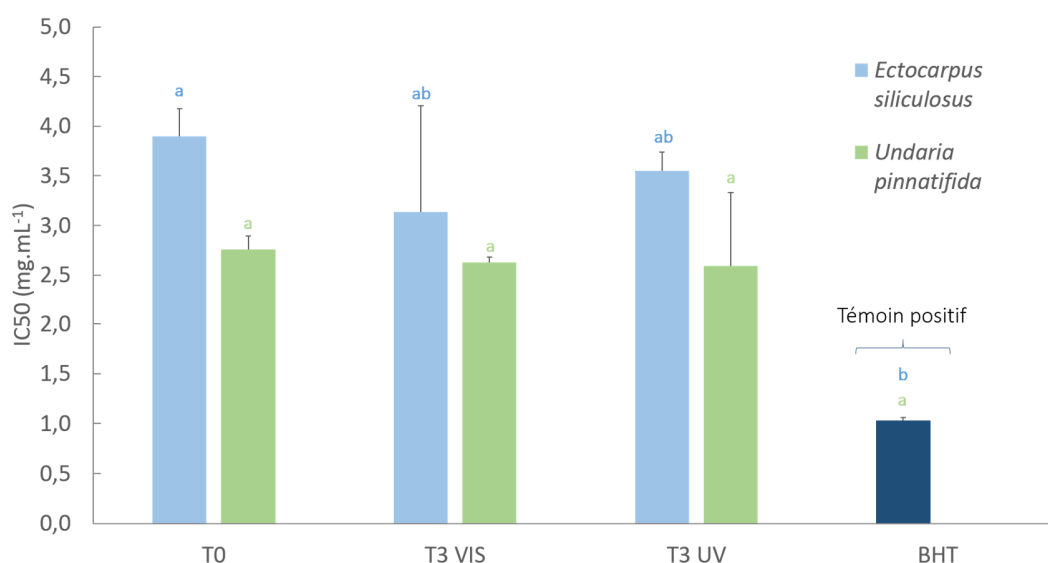


Figure 3-15 : Activité antiradicalaire par le test du DPPH des extraits d'*E. siliculosus* et *U. pinnatifida* obtenus après 3 semaines de culture sous UV (T3 UV) ou non (T3 VIS) et au lancement de la culture (T0). Les lettres indiquent une différence significative entre les extraits, en bleu pour *E. siliculosus* et en vert pour *U. pinnatifida* (Kruskal-Wallis, $p = 0,019$ pour *E. siliculosus* et $p = 0,066$ pour *U. pinnatifida*).

2.3.3.4 Activité photoprotectrice

Les activités photoprotectrices des extraits ont également été mesurées, montrant des Facteurs de Protection Solaire (SPF et PF-UVA) supérieurs à 1 pour l'ensemble des conditions testées et pour les deux espèces (Tableau 3-2). Il existe donc une activité photoprotectrice des extraits mais qui reste faible. Pour *E. siliculosus*, le SPF entre le T0 et T3VIS n'est pas différent et diminue au bout de 3 semaines sous UV. Cette différence est moins marquée pour *U. pinnatifida*, avec un SPF plus fort au bout de 3 semaines sans UV, comparativement au T0. Une augmentation du SPF est aussi remarquée entre le T0 et au bout de 3 semaines mais moins forte.

Tableau 3-2 : Activités photoprotectrices exprimées en SPF et en PF-UVA des extraits de CSP obtenus au début du lancement de la culture (T0) et au bout de 3 semaines dans deux conditions de culture différentes, dans le visible (T3 VIS) et sous UV (T3 UV).

Extrait	<i>Ectocarpus siliculosus</i>		<i>Undaria pinnatifida</i>	
	SPF	PF-UVA	SPF	PF-UVA
T0	1,22 ± 0,02	1,18 ± 0,02	1,12 ± 0,01	1,07 ± 0,01
T3 VIS	1,17 ± 0,03	1,14 ± 0,03	1,24 ± 0,03	1,25 ± 0,03
T3 UV	1,10 ± 0,02	1,09 ± 0,02	1,16 ± 0,02	1,18 ± 0,03

2.4 Discussion

2.4.1 Impact du conditionnement sur la teneur en composés phénoliques actifs

Comme l'extraction des composés phénoliques des algues fraîches est souvent difficile à mettre en place immédiatement, le conditionnement des algues est primordial et doit être optimisé pour prévenir la dégradation des composés et de leurs activités. Différentes méthodes de conservation sont possibles. Dans notre étude, nous avons testé quatre conditionnements différents sur des stades précoces (SP) d'*U. pinnatifida* : frais, congelé, lyophilisé ou séché à l'étuve 30°C. Les composés phénoliques ont été extraits grâce à l'éthanol absolu et plus faiblement avec l'eau, avec une teneur en CP maximale obtenue de 22,7 mg de CP.g⁻¹ d'extrait sec (= 22,7 g de CP.kg⁻¹ d'extrait sec) pour l'extrait congelé obtenu par macération à l'éthanol. Dans la littérature, seulement des teneurs en CP d'extraits de sporophytes d'*U. pinnatifida* au méthanol ou à l'acétone ont été obtenus : Jiménez-Escrig et al. (2001) et Fernández-Segovia et al. (2018) ont mesuré des teneurs en CP de 6,6 g équivalent phloroglucinol.kg⁻¹ de matière sèche et 2,6 mg équivalent acide gallique/g d'algues séchées respectivement pour des extraits au méthanol tandis que Rodríguez-Bernaldo de Quíros et al. (2010) et Guinea et al. (2012) ont mis en évidence des teneurs de 6,0 g équivalent phloroglucinol.kg⁻¹ d'extrait humide et de 2,4 g équivalent phloroglucinol.kg⁻¹ d'extrait sec respectivement pour des extraits à l'acétone. Dans notre étude, nous obtenons donc des teneurs en CP trois fois plus élevées que ceux de la littérature, pouvant être due au fait que nous avons étudié les SP et non les sporophytes mais aussi au choix du solvant d'extraction. En effet, le solvant d'extraction impacte l'extraction des CP comme la montré Wang et al. (2009) avec une teneur en CP plus élevée obtenue avec de l'acétone à 70% plutôt que de l'eau (100%) pour 7 algues brunes (*Laminaria digitata*, *L. hyperborea*, *Saccharina latissima*, *Alaria esculenta*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* et *F. serratus*).

Par ailleurs, [O'Sullivan et al. \(2013\)](#) ont montré une meilleure activité antioxydante associée aux composés phénoliques d'*A. nodosum* en utilisant un mélange éthanol:eau de 80:20 (v:v) plutôt qu'un mélange méthanol:eau de 60:40 (v:v). Le pourcentage du solvant choisi impacte également l'extraction des CP car l'activité est plus faible avec un mélange éthanol:eau de 60:40 (v:v).

Nous avons montré que la congélation permet de maintenir davantage la teneur en CP et l'activité anti-radicalaire. La lyophilisation permet également de maintenir une activité anti-radicalaire, autant qu'avec la congélation. D'autre part, le séchage à l'étuve dégrade une partie ces composés phénoliques actifs. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par [Le Lann et al. \(2008\)](#). Ces auteurs ont étudié l'effet de différents conditionnements sur la teneur en composés phénoliques et leurs activités antioxydantes associées, sur deux macroalgues brunes, *Sargassum muticum* et *Bifurcaria bifurcata* : frais, congelé pendant 3 semaines, lyophilisé pendant 72 h, séché au four à 50-60°C pendant 48 h ou à l'air libre en serre pendant 72 h. L'extraction a été réalisée avec un mélange méthanol:eau (50:50). La plus forte TCP est obtenue lorsque les algues sont extraites fraîches, congelées ou lyophilisées. Les algues séchées au four et surtout en serre ont présenté des teneurs plus faibles en CP et des activités antioxydantes plus faibles que celles fraîches ou congelées. L'étude de [Wong & Cheung \(2001\)](#) a aussi montré que la teneur en CP des extraits de 3 espèces de Sargasses séchés au four est significativement plus faible que celles obtenues à partir d'algues lyophilisées. Le séchage à chaud n'est pas la méthode optimale pour conserver les composés phénoliques mais donc plutôt la congélation ou la lyophilisation. Dans le brevet de [Cattuzzato et al. \(2018\)](#), la lyophilisation est utilisée comme un moyen de conservation plus pratique de gamétophytes d'*U. pinnatifida*, juste à réhydrater pour être utilisé.

2.4.2 Fragmentation des SP selon les techniques utilisées

La fragmentation est une méthode de pré-extraction intéressante. De manière générale, différentes techniques permettent de fragmenter en plus petits morceaux certaines biomasses, augmentant ainsi la surface d'échange de la matière algale avec le solvant, conduisant ainsi à une meilleure solubilisation des molécules algales des tissus vers le solvant d'extraction et donc un meilleur rendement. Ces méthodes de fragmentation permettent aussi de casser les parois cellulaires et libérer le contenu cellulaire et donc les molécules d'intérêt. Dans notre étude, des essais aux ultrasons (avec un bain ou une sonde), aux micro-ondes ainsi que le cryobroyage ont été testés, en association ou non. Nous avons montré que le cryobroyage couplé aux ultrasons avec la sonde permet de fragmenter plus fortement les SP d'*U. pinnatifida* et *A. esculenta*, suivi par le cryobroyage seul, les ultrasons avec la sonde seuls, les micro-ondes couplés aux ultrasons avec le bain, les ultrasons avec le bain seuls. Certaines études ont montré de

meilleures extractions suite à des méthodes de pré-traitement aux ultrasons pour l'extraction. C'est le cas de l'étude de [Toma et al. \(2001\)](#) qui a montré une augmentation du rendement d'extraction (calculée par la valeur extractive) de plantes médicinales avec un bain à ultrasons (33 kHz), une sonde à 20 kHz ou un réacteur à ultrasons de 500 kHz. Ces ultrasons peuvent permettre d'améliorer considérablement l'extraction d'un composant cible principalement par le phénomène de cavitation ([Chemat et al., 2017](#)). C'est ce qu'a montré l'étude de [Le Guillard et al. \(2016\)](#), qui a étudiée l'association des ultrasons (produits par un réacteur tubulaire Sonitube® 35 kHz, Syntetude SAS) à une extraction enzymatique pour l'extraction de molécules polaires chez une algue rouge *Grateloupia turuturu*. D'un point de vue biochimique, la combinaison des 2 méthodes a permis d'extraire plus de composés azotés et carbonés comme les polysaccharides et les acides aminés. Les ultrasons amélioreraient l'hydrolyse enzymatique en augmentant le transfert de masse et la désagrégation de l'algue due à l'implosion des bulles de cavitation produites. Par ailleurs, dans notre étude, nous avons observé que le bain aux ultrasons est moins efficace que l'utilisation d'une sonde qui va agir plus précisément sur les cellules à fragmenter. Comme l'ont montré [Chemat et al. \(2017\)](#), les bains à ultrasons sont moins coûteux mais la reproductibilité et la puissance sont plus faibles qu'une sonde à ultrasons. De plus, l'intensité délivrée est fortement atténuée par l'eau contenue dans le bain. Les sondes à ultrasons sont donc davantage privilégiées notamment pour leur plus forte puissance et leur précision. Les bains à ultrasons peuvent cependant être optimisés grâce à une association aux micro-ondes comme le montre notre étude mais restent moins intéressants en termes de fragmentation que les ultrasons avec la sonde seule. Le cryobroyage est aussi considérée comme un procédé de pré-traitement intéressant et a prouvé son efficacité dans de nombreuses études. En effet, [Vandanjon et al. \(2016\)](#) l'ont utilisé avant d'extraire les composés phénoliques de la macroalgue brune *Sargassum muticum*. Cette méthode est également utilisée pour casser les cellules chez les microalgues comme l'ont étudié [Laurens & Wolfrum \(2011\)](#) sur *Nannochloropsis* sp., *Chlorococcum* sp., *Spirulina* sp. ou [Ma et al. \(2015\)](#) sur *Chlorella variabilis*, *Scenedesmus regularis*, *Ankistrodesmus gracilis* ou encore [Castro-Puyana et al. \(2017\)](#) sur *Neochloris oleoabundans*. Cependant, selon les espèces de microalgues et comparativement à d'autres méthodes de fragmentation/extraction, cette méthode n'est pas la plus efficace, à l'inverse de notre étude. C'est le cas de l'étude de [Serive et al. \(2012\)](#) dont le cryobroyage n'a pas montré d'efficacité de fragmentation puisque les cellules des microalgues *Porphyridium purpureum* et *Phaeodactylum tricornutum* sont restées entières après traitement.

2.4.3 Variation de la TCP des SP selon la méthode de fragmentation et/ou d'extraction

Toutes les méthodes de pré-traitement citées précédemment ont été menées et ont été suivies d'une macération à l'eau puis à l'éthanol sur les SP d'*Undaria pinnatifida* pour obtenir des extraits enrichis en

composés phénoliques. La macération à l'éthanol sans pré-traitement préalable permet d'obtenir la plus forte teneur en composés phénoliques, TCP, (enregistrée pour les SP) avec une teneur de $91,1 \text{ mg.g}^{-1}$ d'extrait sec. Ensuite, les TCP les plus élevées sont celles obtenues avec un pré-traitement aux micro-ondes, aux ultrasons (avec un bain) ou l'association des deux suivis d'une macération à l'éthanol pour chaque. Pour la macération à l'eau, que ce soit avec un pré-traitement ou non, les TCP sont nettement plus faibles que celles obtenues avec l'éthanol. Le solvant a donc un impact non négligeable sur l'extraction des CP, davantage que les techniques de fragmentation (cf paragraphe précédent). De plus, la combinaison cryobroyage/ultrasons suivie d'une macération à l'eau:éthanol (1:1) ne montre pas de TCP aussi intéressante ($5,4 \text{ mg.g}^{-1}$ d'extrait sec) que celle obtenue avec la macération seule à l'éthanol ($91,1 \text{ mg.g}^{-1}$ d'extrait sec), et plutôt équivalente à celle obtenue avec la macération seule à l'eau ($5,9 \text{ mg.g}^{-1}$ d'extrait sec). Cette association de méthodes a également été menée sur les SP d'*Alaria esculenta* et montre une teneur équivalente de l'ordre de $7,6 \text{ mg.g}^{-1}$ d'extrait sec. Pourtant, c'est cette association du cryobroyage et des ultrasons qui permettait de fragmenter le plus les SP et l'efficacité du cryobroyage a notamment été démontrée par [Vandanjon et al. \(2016\)](#) pour l'extraction de CP chez *Sargassum muticum*. Nous avons vu précédemment que l'éthanol permettait d'extraire davantage les CP d'*U. pinnatifida*, il serait donc intéressant de tester à nouveau cette association du cryobroyage et des ultrasons avec la sonde suivie d'une macération à l'éthanol absolu pour observer si nous obtenons davantage de CP. Une méthode d'extraction alternative à la macération a également été menée sur les SP d'*U. pinnatifida* avec un mélange eau:éthanol (25:75, v:v) : l'extraction accélérée par solvant. Elle n'a pas permis d'obtenir une teneur en CP plus élevée que la macération à l'eau ou à l'éthanol précédée ou non de techniques de fragmentation. Pourtant, le mélange à l'éthanol est plus élevée avec 75% se rapprochant des 100%, nous aurions donc pensé pouvoir obtenir des TCP plus élevées que celle de l'extrait obtenu par macération eau:éthanol (50:50, v:v) précédée de cryobroyage et ultrasons. Pourtant, la TCP de l'extrait ASE est plus proche d'une macération eau ou eau:éthanol qu'éthanol absolu.

2.4.4 Orientation métabolique

Sous l'effet de différents facteurs biotiques ou abiotiques, certaines espèces d'algues adaptent leur métabolisme et ainsi produisent des métabolites particuliers afin de se protéger des nombreux stress environnementaux. Lorsque les algues sont cultivées dans des bacs de culture, il est possible de contrôler et modifier la production de certains métabolites en modifiant un ou plusieurs paramètres de la culture. Par exemple, [Robles Centeno & Ballantine \(1999\)](#) ont étudié l'effet de l'irradiance entre 5 et $70 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sur la production de métabolites antibiotiques chez des gamétophytes et tétrasporophytes de l'algue rouge *Spyridia filamentosa*. De faibles changements d'irradiance ont amené à des activités

contre des microorganismes différents et à des degrés d'activités différents suggérant donc la production de métabolites antibiotiques différents selon les irradiances. Ces changements d'irradiance ou encore de radiations UV sont des sources de stress chez les algues, qui se protègent donc en produisant notamment des molécules photoprotectrices, ou molécules écran, comme les pigments ou encore les composés phénoliques (Pavia et al., 1997 ; Karsten et al., 2009). Concernant les composés phénoliques, Pavia et al. (1997) ont montré chez *Ascophylum nodosum* une augmentation de 30% de la concentration moyenne en phlorotannins en ajoutant 50% de rayonnements UV-B. De la même manière, Tanniou (2014) a montré que la quantité de composés phénoliques chez *Sargassum muticum* a significativement doublé en condition de stress (UV-A/UV-B) au bout de 25 jours de culture. Dans notre étude, nous avons cultivé des stades précoces d'*U. pinnatifida* et d'*E. siliculosus* sous radiations UV pour observer si une augmentation des CP était possible. Pour les SP d'*E. siliculosus*, au bout de 3 semaines de culture sous UV (T3UV), la TCP est plus faible que celle obtenue à T0 (au lancement de la culture) et celle obtenue au bout de 3 semaines de culture sans UV (témoin T3VIS). Pour les SP d'*U. pinnatifida*, la TCP n'a pas montré de différence significative entre les cultures sous UV et sans UV. Cependant, nous observons une tendance avec une diminution de la teneur en CP entre T0 et le témoin sans UV, alors que la TCP est légèrement plus élevée après 3 semaines sous UV comparativement au T0. Dans le cadre des SP des deux espèces étudiées, la culture sous radiations UV n'a donc pas permis d'augmenter la TCP. Ces résultats sont davantage en accord avec ceux obtenus par Henry & Van Alstyne (2004), qui ont étudié l'effet des radiations UV-B et UV-A sur la production de phlorotannins chez des stades zygotes et juvéniles de l'algue brune *Fucus gardneri*, après fixation sur un substrat. Trois traitements lumineux différents ont été appliqués sur 3 semaines : les jeunes stades ont été mis sous lumière ambiante, sous filtre UV-B et sous un filtre bloquant les UV-A et UV-B. Les auteurs ont montré que la teneur en phlorotannins ne différait pas selon le traitement lumineux appliqué. Ils émettent l'hypothèse que les zygotes sont sensibles aux UV et développent une tolérance lors de leur maturation en augmentant la production de phlorotannins. Cependant, la production de phlorotannins à n'importe quel stade de croissance n'est pas induite par les UV ou le serait après les 3 semaines de culture. Une autre étude a montré la photodégradation des phlorotannins après une exposition étendue aux radiations UV (Roleda et al., 2010). La fonction de protection contre les UV des phlorotannins est observée seulement après 8 h mais pas après 16 h d'exposition aux UV chez *Laminaria digitata*. Une exposition plus longue correspondant à 16 h à la lumière visible avec des radiations UVA et UVB amènent à une dégénérescence des cellules après 6 jours de culture. Une exudation possible des CP dans le milieu de culture s'est peut-être réalisée.

2.5 Conclusion

Les stades précoces (SP) d'*Undaria pinnatifida* ont montré des teneurs en CP plus intéressantes que les sporophytes, cependant les teneurs restent faibles comparativement à d'autres algues comme les Fucales. Le conditionnement permettant de conserver au maximum la teneur en CP a été retrouvé lorsque les SP sont congelées, ou dans une seconde mesure, lyophilisées chez *Undaria pinnatifida*. En termes de valorisation à grande échelle, la congélation est moins coûteuse mais conserver ces SP en poudre sous forme lyophilisée est aussi un avantage pour le stockage notamment. Un séchage doux peut être une alternative pour garder l'intégrité des composés d'intérêt. La macération à l'éthanol permet d'obtenir des extraits enrichis en CP. Cependant, les techniques de fragmentation des SP n'ont pas permis d'améliorer l'extraction de ces métabolites. D'autres expériences pourront être menées avec la macération pour pouvoir optimiser davantage et obtenir des extraits encore plus enrichis en CP. Par ailleurs, une culture des SP d'*U. pinnatifida* et d'*E. siliculosus* sous radiations UV n'a pas permis d'augmenter leur teneur en CP. Cependant d'autres paramètres environnementaux pourraient être testés pour favoriser la production de phlorotannins chez ces deux espèces, comme un changement de salinité, une augmentation des concentrations en nutriments et/ou de la température. L'extraction de ces composés phénoliques chez les SP n'est pas encore optimisée mais s'avère être une biomasse innovante comme matière première pour la cosmétique notamment. En effet, un brevet existe déjà sur l'utilisation de gamétophytes d'*U. pinnatifida* en tant qu'actif anti-âge pour la cosmétique mais sous forme d'un extrait lipophile probablement riche en fucoxanthine (Cattuzzato et al. 2016).

3. Variation saisonnière des phlorotannins actifs suivie par la RMN du proton et des tests *in vitro*

La production de molécules par les algues peut dépendre de nombreux paramètres environnementaux et notamment de stress biotiques ou abiotiques. Ainsi, la composition de ces algues peut être modifiée au cours du temps en fonction des saisons. Cette étude a porté sur les variations saisonnières et annuelles de la teneur en composés phénoliques de sept algues brunes bretonnes (*Alaria esculenta*, *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata*, *Fucus serratus*, *Halidrys siliquosa*, *Himanthalia elongata* et *Laminaria ochroleuca*) et leurs activités associées. Les composés phénoliques ont été extraits par macération suivie d'une purification liquide/liquide pour obtenir des fractions enrichies en ces molécules quantifiées par le test du Folin-Ciocalteu. La Résonance Magnétique Nucléaire du proton a permis de valider la présence de ces CP et comparer les signaux phénoliques suggérant différents types de phlorotannins. Les activités associées, antioxydantes, photoprotectrices et anti-âge ont été évaluées par des tests *in vitro*. Des variations temporelles sont apparues pour cinq algues dont la teneur en composés phénoliques était la plus élevée en automne. Les Fucales, en particulier *A. nodosum*, *F. serratus*, *H. elongata* et *H. siliquosa*, présentaient des teneurs plus élevées que les Laminariales. Les activités antioxydantes et photoprotectrices ont montré des activités semblables aux molécules commerciales. *A. nodosum* et *F. serratus* ont également présenté une activité anti-âge supérieure à l'épigallocatechine gallate, un flavonol actif de thé. Ces résultats sont prometteurs pour l'utilisation de ces algues abondantes comme source d'ingrédients actifs naturels pour des applications industrielles.

Une partie de ces travaux a fait l'objet d'une présentation orale en anglais lors du congrès International Seaweed Symposium (ISS2019) qui s'est déroulé en avril/mai 2019 en Corée du Sud. Ces travaux font l'objet d'un manuscrit rédigé en anglais ci-dessous, accepté en décembre 2019 dans une édition spéciale ISS19 de *Journal of Applied Phycology* (<https://doi.org/10.1007/s10811-019-02022-1>).

Active phlorotannins from seven brown seaweeds commercially harvested in Brittany (France) detected by ¹H NMR and *in vitro* assays: temporal variation and potential valorization in cosmetic applications

Leslie Gager¹✉, Solène Connan¹, Magalli Molla², Céline Couteau³, Jean-François Arbona², Laurence Coiffard³, Stéphane Cérantola⁴, Valérie Stiger-Pouvreau¹

¹ Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, F-29280 Plouzane, France

² C-WEED Aquaculture, 15 rue de l'Herminette, 35350 Saint-Méloir-des-Ondes, France

³ Faculty of Pharmacy, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, LPiC, MMS, EA2160, 9 rue Bias, BP53508, 44 000 Nantes, France

⁴ Plateforme RMN-RPE Université de Bretagne Occidentale (UBO), 6 avenue Victor Le Gorgeu, CS93837, 29238 Brest Cedex 3, France

✉leslie.gager@gmail.com

Abstract

This study was focused on the phenolic content and associated cosmetic activities of seven brown marine macroalgae: *Alaria esculenta*, *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata*, *Fucus serratus*, *Halidrys siliquosa*, *Himanthalia elongata*, and *Laminaria ochroleuca*, selected for their abundance in Brittany and their phlorotannin production. Phlorotannins were extracted by maceration followed by a liquid/liquid purification to obtain fractions enriched in phlorotannins. Seasonal and yearly variations in phenolic contents were investigated thanks to the Folin-Ciocalteu assay to find the best harvesting season for each species. ¹H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) was used to validate the presence of phenolic compounds and to compare the species in terms of phenolic signals, as they produce different phlorotannin molecules. Activities required for cosmetic applications (i.e. radical scavenging,

antioxidant, photoprotective, and anti-aging activities) were assessed by *in vitro* tests. Fucales, especially *A. nodosum*, *F. serratus*, *H. elongata*, and *H. siliquosa*, showed higher phenolic contents than Laminariales. Temporal variations were apparent for five seaweeds with the highest phenolic content, notably in autumn. The phenolic content was high regardless of the season and antioxidant and photoprotective activities were similar to those of commercial molecules, allowing year-round algal harvesting. The anti-aging activity of *A. nodosum* and *F. serratus* fractions was higher than the active tea flavonol, epigallocatechin gallate. These results are promising for the use of abundant marine macroalgae as a source of natural active ingredients for cosmetic applications.

Keywords

Antioxidant, brown algae, Cosmeceutical Monitoring, NMR analysis, Polyphenols, Seasonality

Introduction

Brittany (France) has a great richness of marine macroalgae, both in terms of species diversity and biomass. Additionally, these marine macroalgae produce a wide range of molecules, such as phenolic compounds, a diverse class of molecules produced by all macroalgae (Geiselman and McConnell, 1981; Jennings and Steinberg, 1997; Swanson and Druehl, 2002; Bruno de Sousa et al., 2017). Brown macroalgae synthesize a particular group of phenolic compounds called phlorotannins. These metabolites protect macroalgae from many environmental constraints including biotic factors such as grazing (Svensson et al., 2007), fouling, and epiphytism (Jenning and Steinberg, 1997), as well as abiotic factors such as light (Abdala-Díaz et al., 2006), temperature (Tanniou et al., 2014), depth in the water column (Le Lann et al., 2012a), nutrient concentration (Yates and Peckol, 1993), and UV radiation (Swanson and Druehl, 2002).

Brittany, in the western part of France, is the main region of the country for algal production (Bourgougnon and Stiger-Pouvreau, 2011), mainly for the extraction of alginates. We wondered therefore if some brown macroalgae could be exploited for the production of other compounds of interest such that these algae/compounds could be proposed to the cosmetic industry. Phlorotannins show interesting bioactivities that could be potentially valorized in many fields (e.g. nutrition or cosmetics) because of their

antimicrobial, antioxidant and photoprotective activities (Thomas and Kim, 2011; Wijesinghe and Jeon, 2011; Freile-Pelegrín and Robledo, 2013; Catarino et al., 2017; Imbs and Zvyagintseva, 2018; Silva et al., 2019; reviewed by Gager et al., *in press*). Today, new, natural anti-aging molecules with multifunctional potential for skin improvement are being increasingly sought to be used in cosmetics.

However, the seasonality aspect of producing such compounds (like phlorotannins) is often neglected when considering their valorization. Indeed, those who conducted previous experiments demonstrated that phenolic levels in Phaeophyceae are governed by a number of environmental factors, as mentioned above. Moreover, phenolic contents can vary with site and season (Connan et al., 2004; Stiger et al., 2004; Plouguerné et al., 2006; Le Lann et al., 2012b).

In this study, we focused on seven brown seaweeds belonging to two different taxonomic orders, Fucales and Laminariales. The Fucales have been chosen because they are abundant at different levels along Brittany shores and are known to be rich in phenolic compounds (Connan et al., 2004; 2006). Some are already harvested by commercial shoreline alga harvesters and are valorized in the agri-food industrial sector. Moreover, their harvest does not represent a threat to their natural populations, given the regulations in use for the collection of some species in Brittany (Philippe, 2013). The Laminariales have been chosen as they

are easily cultivated on ropes in open-sea aquaculture systems; their production is thus not dependent on wild populations.

The presence and levels of algal phenolic compounds can be evaluated by different colorimetric methods, most often the Folin-Denis or Folin-Ciocalteu (FC) assays, known to be quick and inexpensive, based on the occurrence of aromatic rings (Freile-Pelegri and Robledo, 2017; Ford et al., 2019; Generalić Mekinić et al., 2019). The FC method is fast and reproducible and was therefore used in this study. It does not, however, allow the differentiation of different phlorotannins, which was done here by Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR). Associated activities for cosmetic valorization were also evaluated, as follows: radical scavenging and antioxidant activities were measured with two colorimetric assays (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl [DPPH] and Ferric Reducing Antioxidant Power [FRAP] tests); photoprotective activity was measured by Sun Protection Factor (SPF); and anti-aging activity was measured by the anti-elastase assay on the fractions showing the highest antioxidant activity.

The aims of this study were (1) to identify the abundant brown seaweeds with the highest phenolic content; (2) to detect temporal changes in the phenolic content of seaweeds collected by commercial harvesters who comply with seaweed collection regulations in Brittany; and (3) to

investigate associated activities (radical scavenging, antioxidant, photoprotective, and whitening) to enable potential valorization in the cosmetics industry.

Materials and methods

Seaweed sampling

Seven species of brown marine macroalgae were collected from the Brittany (France) coastline by SME C-WEED Aquaculture: five Fucales *Bifurcaria bifurcata* R. Ross, *Halidrys siliquosa* (Linnaeus) Lyngbye (Sargassaceae), *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis, *Himanthalia elongata* (Linnaeus) S.F. Gray, and *Fucus serratus* Linnaeus (Fucaceae); and two Laminariales, *Alaria esculenta* (Linnaeus) Greville (Alariaceae) and *Laminaria ochroleuca* Bachelot de la Pylaie (Laminariaceae). They were harvested from different sites depending on the biomass availability at each site: *A. esculenta*, *B. bifurcata*, *H. siliquosa*, *L. ochroleuca* in North Finistère; *A. nodosum*, *H. elongata* in Côtes d'Armor; and finally, *F. serratus* in Ile-et-Vilaine. The seaweeds were hand-harvested by cutting the thalli with a sickle and leaving part of the thalli for regeneration growth, particularly for *A. nodosum*, *F. serratus*, and *H. elongata* (the size of this part differed according to species [Philippe, 2013]). Entire seaweed thalli without holdfast were harvested for each species. As algal biomass was provided in a pre-crushed state (see below), fertility could not be observed. We thus assumed that thalli were fertile in the periods reported in the literature (Connan et al.,

2004; Cabioc'h et al., 2014; Bunker et al., 2017) (Table 1), although Bevilacqua et al. (2019) observed recent modifications in the reproductive timing of some brown macroalgae in the Mediterranean Sea due to temperature variations. However, this change has not yet been observed in North Brittany, even if a slight temperature increase was observed in Brittany between 1992 and 2012 but the weakest in the North Brittany (Gallon et al., 2014). Seaweeds were harvested either from exposed (*F. serratus*, *H. elongata* and *A. esculenta*) or from sheltered (*B. bifurcata*, *H. siliquosa*, *L. ochroleuca*, and *A. nodosum*) shores. All seaweeds were harvested at low tide in different seasons over 2 to 3 years (2015 to 2017), in line with biomass availability and harvesting periods in Brittany (Table 1). *Himanthalia elongata* was only harvested in summer and autumn because this perennial seaweed is not available in the other seasons due to loss of large straps (receptacles) in winter and because, in spring, strap growth starts with a small, button-like thallus (vegetative) of a few centimeters. *Alaria esculenta* also has strongly seasonal growth, which is why it was not harvested in winter.

After their collection, seaweeds were dried by the SME C-WEED Aquaculture at 30°C maximum in a shed with circulating air to preserve phenolic compounds. The air-dried algae were homogenized to remove the effects of intra- and inter-individual variability, pre-crushed with a stainless-steel mill, and ground using a ball mill (Retsch MM400,

Germany) with the final objective of reproducing the industrial process.

Extraction and purification

Solid/liquid extraction followed by liquid/liquid purification was performed according to Stiger-Pouvreau et al. (2014) and Ar Gall et al. (2015) to obtain fractions enriched in phenolic compounds.

Solid/liquid extraction

To obtain crude extracts, 15 g of algal powder were extracted in duplicate (from the same batch) in 150 mL ethanol:water (50:50, v:v) for 2 h in the dark at 40°C, with stirring at 200 rpm (Julabo GmbH SW22, Germany). Samples were then centrifuged at 3,000 g (Eppendorf Centrifuge 5810, Germany) for 5 min and the supernatant was recovered. The pellet was extracted a second time with 150 mL of the same solvent mixture for each duplicate for 1 h followed by centrifugation. A volume of 300 mL of supernatant for each duplicate was obtained, pooled and evaporated at 40°C using a rotary evaporator (Laborota 4000 efficient, Heidolph, Germany) to obtain a crude extract of 100 mL.

Liquid/liquid purification

Each crude extract was semi-purified to concentrate the phlorotannins. Similar to the work of Stiger-Pouvreau et al. (2014), the purification was split into three distinct steps: (1) three washes with dichloromethane to remove lipids; (2) rinsing of the aqueous phase containing the phenolic compounds with acetone and then ethanol to remove carbohydrates and proteins;

Table 1. Commercial harvesting seasons of the seven brown seaweeds from Brittany (France) over three different years, 2015, 2016, and 2017, and in different seasons depending on the species. The period of reproduction is also mentioned for each seaweed. A = Autumn, W = Winter, Sp = Spring, and Su = Summer.

Year	2015	2016	2016	2016	2016	2017	2017	2017	2017	Reproduction time (from the literature)
Seasons	A	W	Sp	Su	A	W	Sp	Su	A	
Seaweeds										
<i>Alaria esculenta</i>	X		X		X					Sp
<i>Ascophyllum nodosum</i>			X	X	X	X				W-Sp
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	X	X	X		X					A to Sp
<i>Fucus serratus</i>	X	X		X	X	X		X		Su-A
<i>Halidrys siliquosa</i>	X	X	X		X	X	X		X	Sp to A
<i>Himanthalia elongata</i>				X	X					Sp to A
<i>Laminaria ochroleuca</i>	X	X	X		X					Su-A

and (3) three washes with ethyl acetate which resulted into two fractions, an aqueous and an ethyl acetate fraction. This last fraction was evaporated using a rotary evaporator; then it was dissolved in water, frozen, freeze-dried, and used for the different subsequent analyses.

Determination of the quantity and quality of phenolic compounds

Folin-Ciocalteu assay

Total Phenolic Content (TPC) was determined with the Folin-Ciocalteu colorimetric assay adapted for microplates (Zubia et al., 2009; Surget et al., 2015). Phloroglucinol, the basic unit of phlorotannins in brown seaweeds, was used as a standard. The wells of the microplates were filled with 20 μL of the fraction, 130 μL distilled water, and 10 μL Folin-Ciocalteu followed by 40 μL Na_2CO_3 at 200 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The mixture was incubated at 70°C in the dark for 10 min. Finally, microplates were deposited on ice to stop the chemical reaction; the absorbance was measured at 620 nm (Multiskan™ FC, Thermo Scientific™, USA). The TPC was expressed in milligrams per gram of dry fraction ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW). This analysis was carried out in triplicate for each fraction.

^1H NMR analysis

Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) was used as a non-invasive spectroscopic technique to observe phenolic compounds in the area of aromatic compounds, between 6.5 and 4.5 ppm (Cérantola et al., 2006) using a Bruker Avance 400.

Five mg of each ethyl acetate fraction were dissolved with 700 μL of deuterated methanol. The spectra were analyzed with MestReNova software (v6.0.2-5475).

Radical scavenging and antioxidant activities

DPPH assay

Radical scavenging activity was evaluated by the DPPH assay. This principle is based on the reduction of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH●) with antioxidant molecules such as phenolic compounds. A volume of 22 μL of fraction was added to 200 μL of DPPH solution at 25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ prepared within 48 hours. After 60 min in the dark at room temperature, the absorbance was read at 540 nm. The negative controls were distilled water and ethanol; positive controls were 2,3-t-butyl-4-hydroxyanisole (butylated hydroxyanisole, BHA) and ascorbic acid (vitamin C). The radical scavenging activity was expressed as the IC50 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), an index corresponding to the concentration of sample necessary to cause 50% neutralization of the DPPH; a low IC50 value would show that a sample has a high radical scavenging activity. This analysis was carried out in triplicate for each fraction.

FRAP assay

Antioxidant activity was evaluated with the FRAP assay, which involves a redox reaction between phenolic compounds of the fraction and transition metal ions like ferric ions. The method adapted from Zubia et al. (2009) was realized on

microplates, 25 μL sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6), 25 μL ferricyanide potassium at 1%, and 25 μL of the fraction put in each well. After homogenization, microplates were incubated at 50°C for 20 min. After stopping the reaction on ice, 25 μL trichloroacetic acid at 10% and 100 μL distilled water were added. A first measurement of the absorbance at 620 nm was made. Then, 20 μL at 0.1% iron chloride was added and, after 10 min, the absorbance was measured again. Vitamin C and BHA were used as positive controls. The FRAP was expressed as the EC50 value ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), meaning that a low EC50 value would show that the sample has a high reducing power. This analysis was carried out in triplicate for each fraction.

Photoprotective activity

The method used was described by Couteau et al. (2007, 2018). Briefly, the fraction was incorporated in a basic oil-in-water emulsion and 50 mg were spread with a fingertip on a polymethylmethacrylate (PMMA) plate. Then, transmission measurements were made on nine replicates using a spectrophotometer (UV transmittance Analyze UV1000S, Labsphere, USA).

Anti-aging activity

Anti-aging activity was evaluated through anti-elastase activity. Elastase is a proteinase, an enzyme capable of degrading elastin, which is an important extracellular matrix protein responsible for skin elasticity. The protocol was adapted from Sallenave et al. (1998). First, a Tris-HCl buffer at 179

mM, pH 8, was made. The substrate, N-succinyl-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide, was then prepared at 1.65 mM with the buffer. The enzyme solution was prepared at a concentration of 0.34 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ with the buffer. In microplate wells, 13 μL of fraction or control were added to 93 μL of buffer and 52 μL of substrate. The microplate was incubated for 5 min at 25°C before finally adding 42 μL of the enzyme. A kinetic was performed at 410 nm, always at 25°C for 4 min. Epigallocatechin gallate (EGCG) was used as a positive control. To obtain the percentage of inhibition of the enzyme, the slope, which corresponds to the initial speed of the enzyme activity, was determined and used in the following calculation:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{S_i - S_{iF}}{S_i} * 100$$

with S_i , the initial speed of the enzyme activity without fraction/control and S_{iF} , the initial speed of enzyme with the fraction/control. Ethyl acetate fractions of three species, *A. nodosum* (Autumn 2016), *F. serratus* (Summer 2017), and *H. siliquosa* (Autumn 2017) were selected, based on their high phenolic content and antioxidant activity; these fractions were tested at three different concentrations: 0.01, 0.05, and 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. This analysis was carried out in triplicate for each fraction.

Statistical analysis

The software R for Windows was used, with the RStudio (v.1.0.136) integrated development environment. All laboratory analyses were

performed in triplicate and results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Homogeneity of variances was tested with the Bartlett test with a risk error of 5%. When homogeneity of variances was confirmed, a one-way ANOVA was performed (total phenolic content and anti-elastase assays). When the variances were not homogeneous, a Kruskal-Wallis test was performed at a significance level of 95% (DPPH and FRAP assays). When significant differences appeared, comparisons were made using the Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR) after Kruskal-Wallis or a Tukey post-hoc test after ANOVA. Pearson correlation coefficients (r) were also calculated to compare relationships between pairs of variables ($p < 0.01$).

Results

Quantitative and qualitative analysis of phenolic compounds

Quantification of phenolic content by Folin-Ciocalteu assay

The two Laminariales, *Alaria esculenta* and *Laminaria ochroleuca*, showed the lowest TPC, which did not exceed 313 mg.g⁻¹ DW (Fig. 1). Differences between seasons, i.e. spring, autumn, and winter, as well as between years, were identified for *L. ochroleuca* ($p < 0.001$ for both factors). The highest content was obtained in autumn 2015 followed closely by spring 2016. For *A. esculenta*, no difference was highlighted between the spring and winter seasons for the

same year ($p = 0.758$) but differences between years were exhibited in autumn (2015 and 2016) ($p < 0.001$). In autumn 2015, *A. esculenta* showed an enriched fraction with 313 mg.g⁻¹ DW (Fig. 1).

The Fucales *Bifurcaria bifurcata* showed a seasonal variation, with the highest TPC in autumn, followed by winter and then spring. As for *A. esculenta*, differences between 2015 and 2016 were observed in autumn ($p < 0.001$). In autumn 2015, *B. bifurcata* presented an enriched fraction with 350 mg.g⁻¹ DW (Fig. 1). The four other Fucales had higher TPC with two species that did not display distinct seasonality (*Halidrys siliquosa* and *Fucus serratus*); two species (*Ascophyllum nodosum* and *Himanthalia elongata*) showed differences according to the studied seasons. However, *H. elongata* fractions had higher TPC in autumn than in summer ($p = 0.009$). Concerning *H. siliquosa*, only one significant difference was observed between autumn 2015 and spring 2017 ($p = 0.014$); otherwise no significant seasonal variation was found, with an average of 841 mg.g⁻¹ DW produced seasonally by macroalgae. Similarly, *F. serratus* fractions exhibited high TPC which did not vary along the three seasons studied, i.e. summer, autumn, and winter for this species with an average of 854 mg.g⁻¹ DW and a significant difference between years ($p < 0.001$). Concerning *A. nodosum*, the TPC was high in spring, summer, and autumn, with an average of 917 mg.g⁻¹ DW and a significantly lower content in winter ($p < 0.001$).

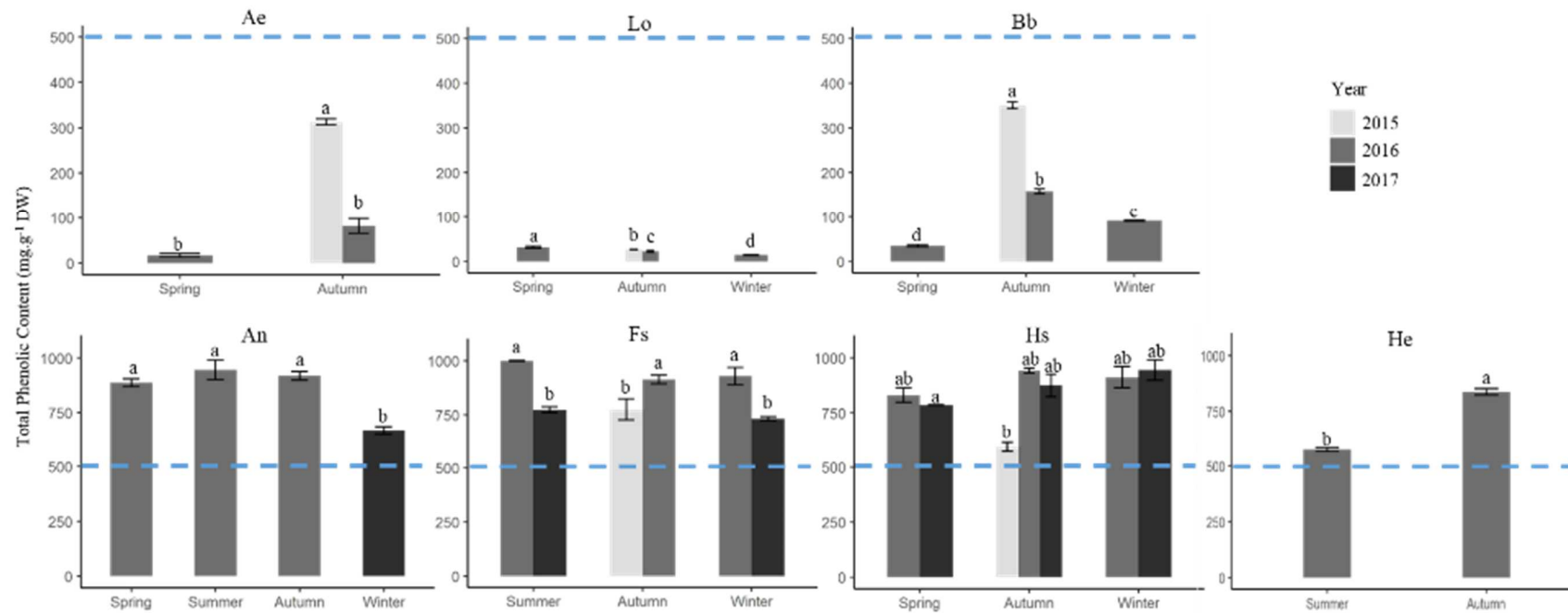


Fig. 1 Total Phenolic Content (TPC) of enriched fractions from seven brown seaweeds harvested in different seasons and years. Different letters indicate significant differences between the fractions harvested in different seasons and years (One-way ANOVA, $p < 0.05$). The blue line represents the value of 500 mg.g⁻¹ DW; allowing the graphs to be compared. *Alaria esculenta* (Ae), *Laminaria ochroleuca* (Lo), *Bifurcaria bifurcata* (Bb), *Ascophyllum nodosum* (An), *Fucus serratus* (Fs), *Halidrys siliquosa* (Hs), and *Himanthalia elongata* (He). Values are means \pm SD (n=3)

¹H Nuclear Magnetic Resonance analysis of ethyl acetate fractions

The ¹H NMR spectra confirmed results on the phenolic content obtained by the colorimetric assay. Indeed, the phenolic compound signals (around 6 ppm) seemed more abundant than other signals (fatty acids, amino acids) for the four Fucales, *H. siliquosa*, *H. elongata*, *A. nodosum*, and *F. serratus*, with these fractions presenting high aromatic/phenolic signals (Fig. 2). For *F. serratus* and *H. elongata*, the phenolic signals were similar in terms of peak intensity and shape, regardless of the season. For *A. nodosum* and *H. siliquosa*, the signals differed, however, especially the peak shape. For *A. nodosum*, the profile zone of phenolic compounds around 6 ppm, obtained for the winter fraction (2017), was different from the other three, with a much more intense peak before 6.25 ppm. For *H. siliquosa*, the profiles appeared to be similar between years in spring and winter, but differences in the autumn profile were observed between 2015, 2016, and 2017, especially as the 2015 peak shape clearly differed from those of 2016 and 2017.

Other molecules, like lipids and amino acids, were also present in the fractions and visible on NMR spectra between 2.5 and 0.5 ppm but at lower abundances than other substances, especially in *H. elongata* and *F. serratus* compared with *H. siliquosa* and *A. nodosum* (Fig. 2). The numerous peaks at around 4 ppm corresponded to mannitol (carbohydrate), which were also observed in some purified fractions. *Ascophyllum nodosum* showed

the highest mannitol signals, followed by *H. elongata* and *H. siliquosa*. Interestingly, *F. serratus* had almost no mannitol signal left in the ethyl acetate fractions and was further decreased by the different washes applied during the purification.

The spectra of *A. esculenta*, *B. bifurcata*, and *L. ochroleuca* are provided in the supplementary data (Fig. S1). The spectra of *A. esculenta* seem to present more intense phenolic compound signals in autumn 2015 than in spring or autumn 2016, which agrees with the highest TPC measurement obtained with the Folin-Cioaltea assay (Fig. 1). Similar results were observed for *B. bifurcata*, but *L. ochroleuca* had low TPC and phenolics were hardly present at all on the spectra. Both Laminariales, like some of the Fucales, showed numerous signals of other molecules (lipids, mannitol, etc.).

Biological activities of enriched extracts

Radical scavenging and antioxidant activities

No significant difference in radical scavenging activity (DPPH test) was observed between seasons and years for the fractions obtained from *A. esculenta* (Fig. 3). However, there was a trend towards a higher scavenging activity for fractions from *A. esculenta* harvested in autumn, with an IC₅₀ of 0.721 (2015) and 0.497 mg.mL⁻¹ (2016). Interestingly, the activity of the autumn fractions was similar to the positive control, vitamin C ($p = 0.212$ for 2015 and $p = 0.564$ for 2016).

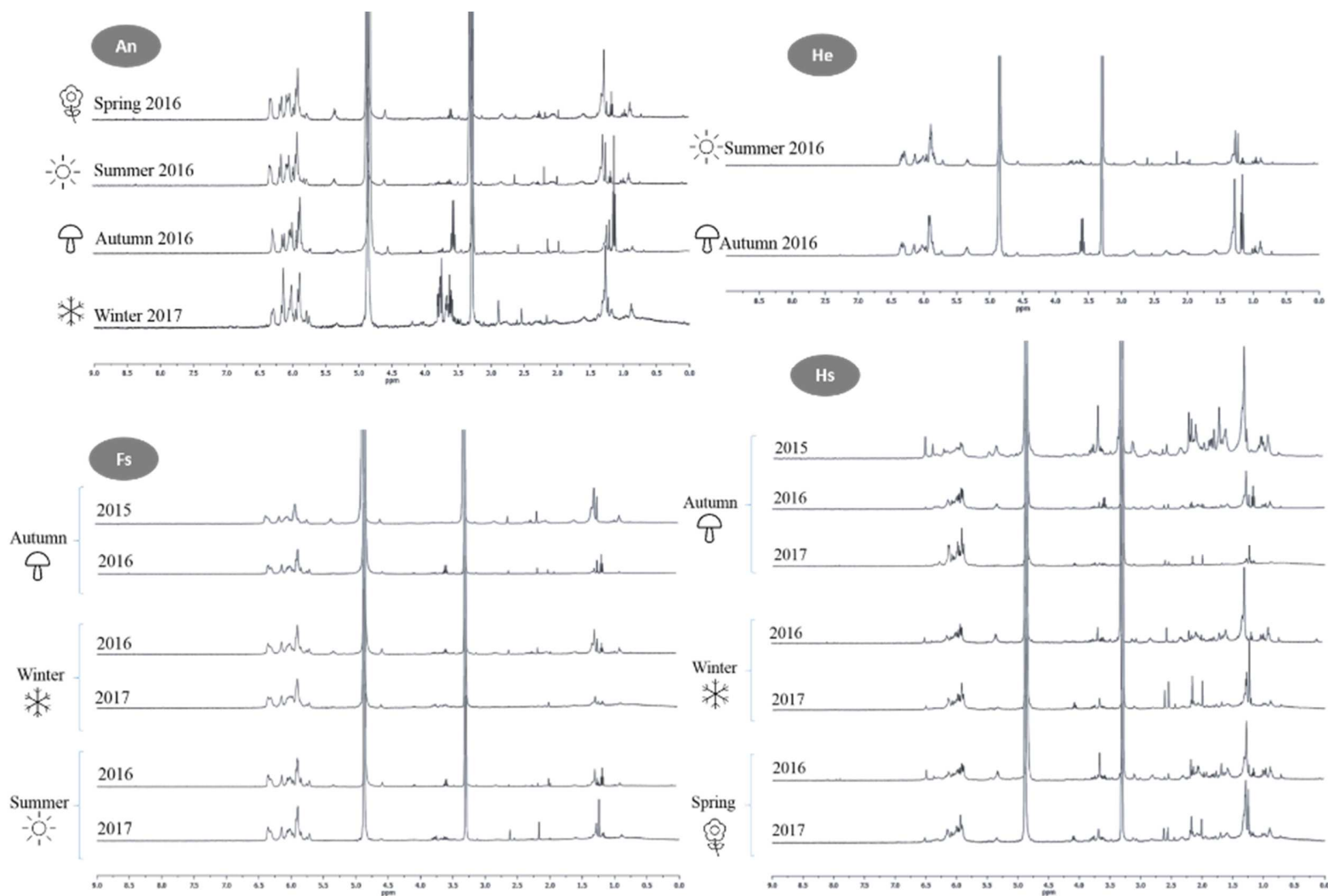


Fig. 2 ^1H NMR spectra of the ethyl acetate fraction from the four brown seaweeds (An, He, Fs, and Hs; see Fig. 1 for species name abbreviations) showing the highest Total Phenolic Content with the Folin-Ciocalteu assay harvested in different seasons and years. PC = Phenolic Compounds, M = Mannitol, and Ap.m = Apolar molecules. The spectra of the fractions derived from Ae, Bb, and Lo are available in the supplementary data (Fig. S1).

With the FRAP assay, significant differences in antioxidant activity were revealed between the seasons (autumn and spring 2016 [$p = 0.007$]) as well as between the years (2015 and 2016 in autumn [$p = 0.048$]). Concerning *L. ochroleuca*, no statistically significant variation was observed ($p > 0.05$), although seaweeds harvested in autumn appeared to have the highest antioxidant activity with both tests.

The five Fucales presented higher activities than Laminariales. Their IC50 values (DPPH assay) were between 0.010 and 0.353 mg.mL⁻¹ and their EC50 values (FRAP assay) were between 0.001 and 0.004 mg.mL⁻¹. No significant differences were shown between seasons or years for the different Fucales in either assay. Nevertheless, antioxidant activities were sometimes higher than vitamin C with, in particular, fractions obtained in spring 2016 for *B. bifurcata* and in autumn 2015 for *F. serratus* ($p = 0.039$ and 0.029, respectively) for the DPPH test. Concerning the FRAP assay, activities of fractions obtained from *A. nodosum* (spring 2016), *F. serratus* (summer 2017), *H. siliquosa*, and *B. bifurcata* (autumn 2015) were significantly higher than the vitamin C ($p = 0.039$, 0.032, 0.039, and 0.026, respectively).

Photoprotective activities

All enriched fractions had potential photoprotective activities since the photoprotective factors were greater than 1 (between 1.24 and 4.35 for SPF; 1.22 and 2.35 for

PF-UVA; Table 2). The highest photoprotective activities were obtained with 4.35 of SPF, 2.35 of PF-UVA in *F. serratus* fraction and 3.92 of SPF, 2.13 of PF-UVA in *H. siliquosa* fraction, with both algae collected in autumn 2016 (Table 2). No seasonal difference was observed for the two Laminariales, *A. esculenta* and *L. ochroleuca*. Moreover, *B. bifurcata*, *H. siliquosa*, *F. serratus*, and *H. elongata* fractions showed the highest photoprotective activities in autumn. According to *A. nodosum*, the summer fraction showed the highest activity.

Anti-aging activity

The three fractions containing the highest phenolic compound levels (from the species: *A. nodosum*, *F. serratus*, and *H. siliquosa*) were tested for anti-elastase assay to determine the anti-aging activity of semi-purified fractions. The fraction derived from *H. siliquosa* did not show anti-elastase activity at any of the three concentrations tested, while *A. nodosum* and *F. serratus* showed anti-elastase activity at 0.05 and 0.1 mg.mL⁻¹, but not at 0.01 mg.mL⁻¹ (Table 3). Their activities at 0.1 mg.mL⁻¹, 86.2 ± 3.4% inhibition in *F. serratus*, and 70.6 ± 3.2% inhibition in *A. nodosum*, were higher than those of the EGCG control (6.6 ± 1.8% inhibition).

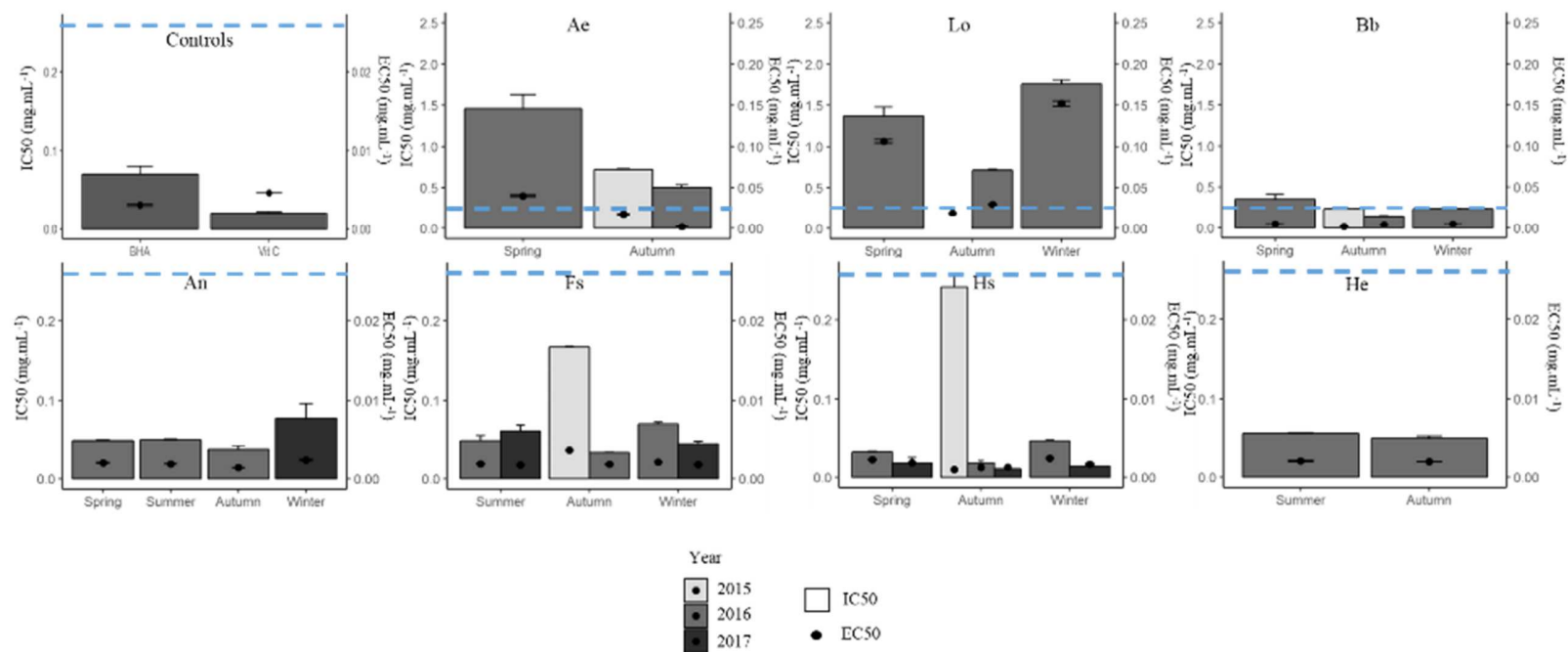


Fig. 3 Radical scavenging (DPPH, IC₅₀, bars) and antioxidant (FRAP, EC₅₀, dots) activities of purified fractions from seven brown seaweeds (See Fig. 1 for species name abbreviations) and positive controls (BHA, vitamin C). The blue line represents the value of 0.25 mg.mL⁻¹ for IC₅₀ and 0.025 mg.mL⁻¹ for EC₅₀; allowing the graphs to be compared. See statistical results in supplementary data (Table S1). Values are means ± SD (n=3)

Table 3 Percentage of elastase inhibition of two phenolics enriched fractions and the positive control epigallocatechine gallate (EGCG). Letters indicate differences between fractions (One-way ANOVA, $p < 0.01$). An: *Ascophyllum nodosum*, Fs: *Fucus serratus*.

Control/Fraction	Concentrations (mg.mL ⁻¹)	% of inhibition
EGCG	0.05	6.6 ± 1.8 (a)
An	0.05	20.4 ± 2.9 (b)
	0.1	70.6 ± 3.2 (c)
Fs	0.05	70.5 ± 2.9 (c)
	0.1	86.2 ± 3.4 (d)

Correlation between Total Phenolic Content and biological activities

A significant positive correlation between TPC and radical scavenging activity was shown for *H. siliquosa*, with a correlation coefficient r of 0.873 ($p = 0.010$) (Fig. S2 in the supplementary data). There was also a positive correlation for *A. nodosum* ($r = 0.919$) but this was not significant ($p = 0.081$).

A significant positive correlation was also shown between TPC and the antioxidant activity determined by FRAP assay for *B. bifurcata* ($r = 0.990$, $p = 0.009$).

For all species except *A. esculenta*, significant positive correlations were found between the two photoprotective activities, SPF and PF-UVA, with r -values ranging from 0.941 to 0.995 ($p < 0.01$ for *A. nodosum* and *F. serratus*; $p < 0.05$ for *B. bifurcata*, *H. siliquosa*, and *L. ochroleuca*).

Discussion

The aims of this study were to quantify the phenolic content of seven brown marine macroalgae abundant in Brittany to evaluate their temporal variations and to investigate their potential as a source of active ingredients for the cosmetics sector. We used ¹H NMR analysis in combination with the traditional Folin-Ciocalteu assay to quantify phenolic levels.

Comparison of phenolic content between species

Brown marine macroalgae are well known to be rich in phlorotannins. In this study, the Fucales, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus serratus*, *Halidrys siliquosa*, and *Himanthalia elongata* (but not *Bifurcaria bifurcata*) contained high levels of phenolic compounds and up to three times more phenolics (>574 mg.g⁻¹ DW) than the Laminariales *Alaria esculenta* and *Laminaria ochroleuca* (35 to 350 mg.g⁻¹ DW), as previously observed by Connan et al. (2004). The difference in TPC between species can be linked to the position of these seaweeds on the shore, with a progressive decrease from species living at the mid-tide level (like *A. nodosum* and *F. vesiculosus*) to those living at the low-tide level, and a minimum in the subtidal *L. digitata* (Connan et al., 2004). In our study, this was the case for *A. nodosum*, *F. serratus*, and *H. elongata*, which presented high TPC and which live at the mid-tide level where they are exposed to UV radiation, heat, and dehydration or salinity stresses that boost their phenolic content.

Table 2. Photoprotective activities as Sun Protection Factor (SPF) and UV-A Protection Factor (PF-UVA), of purified fractions from seven brown seaweeds harvested in Brittany (See Fig. 1 for more details). Maximal values are written in bold for SPF and PF-UVA.

Seaweed	Season	Year	SPF	PF-UVA
Ae	Spring	2015	1.56 ± 0.02	1.35 ± 0.01
	Autumn	2015	1.76 ± 0.60	1.73 ± 0.69
		2016	1.77 ± 0.09	1.59 ± 0.08
Lo	Spring	2016	1.54 ± 0.10	1.40 ± 0.08
	Autumn	2015	1.24 ± 0.07	1.19 ± 0.06
		2016	2.15 ± 0.11	1.96 ± 0.09
	Winter	2016	2.00 ± 0.27	1.76 ± 0.22
Bb	Spring	2016	1.73 ± 0.07	1.35 ± 0.03
	Autumn	2015	2.70 ± 0.15	2.01 ± 1.11
		2016	3.07 ± 0.11	2.05 ± 0.10
	Winter	2016	1.59 ± 0.14	1.37 ± 0.09
An	Spring		1.81 ± 0.08	1.52 ± 0.05
	Summer	2016	2.71 ± 0.37	1.93 ± 0.19
			1.71 ± 0.06	1.47 ± 0.02
	Winter	2017	1.46 ± 0.03	1.28 ± 0.03
Fs	Summer	2016	1.44 ± 0.06	1.22 ± 0.03
		2017	1.81 ± 0.04	1.41 ± 0.02
	Autumn	2015	1.75 ± 0.35	1.28 ± 0.02
		2016	4.35 ± 0.21	2.35 ± 0.08
	Winter	2016	2.37 ± 0.13	1.76 ± 0.06
		2017	2.14 ± 0.11	1.59 ± 0.06
Hs	Spring	2016	2.21 ± 0.26	1.49 ± 0.01
		2017	3.35 ± 0.08	2.09 ± 0.04
	Autumn	2015	3.92 ± 0.72	2.13 ± 0.13
		2016	3.60 ± 0.81	2.40 ± 0.43
		2017	2.83 ± 0.21	1.85 ± 0.09
	Winter	2016	1.90 ± 0.22	1.37 ± 0.08
		2017	2.15 ± 0.13	1.60 ± 0.06
He	Summer	2016	1.51 ± 0.09	1.27 ± 0.05
	Autumn		2.24 ± 0.10	1.69 ± 0.05

However, *Halidrys siliquosa* also contained one of the highest phenolic levels despite being almost constantly submerged. Other factors may thus boost its phenolic production such as grazing or nutrients.

Temporal variation of phenolic content

Temporal variations of TPC were observed between years and between seasons depending on the species. Our study highlights variation of TPC between years in autumn for *A. esculenta*, *B. bifurcata*, and *L. ochroleuca*, with the highest TPC in 2015 compared to 2016. Furthermore, *F. serratus* showed yearly variations in winter, autumn, and summer, with the highest TPC in 2016 for the three seaweeds compared to 2015 for autumn and 2017 for the other two seasons. This yearly variation could be the result of yearly evolution of some biotic and abiotic factors such as light intensity (Pavia et al., 1997; Le Lann et al., 2012b), grazing (Svensson et al., 2007), or nutrients (Connan and Stengel, 2011).

Variations according to seasons were also observed for five seaweeds of the seven studied: the highest TPC was found in spring, summer, and autumn for *A. nodosum*; in spring for *L. ochroleuca*; and in autumn for *H. elongata*, *B. bifurcata*, and *A. esculenta*. On the contrary, the phenolic content of *F. serratus* and *H. siliquosa* displayed no seasonal variation. Previous studies on the phenolic content of brown seaweeds have shown differing seasonal peaks. The highest content can sometimes be

found in autumn, such as in the findings of Le Lann et al. (2012a) for *B. bifurcata*; in summer, such as observed for *A. nodosum*, *B. bifurcata*, *Cystoseira baccata*, *C. amentacea*, *C. tamariscifolia*, *Fucus serratus*, *F. spiralis*, *F. vesiculosus*, *H. elongata*, and *Pelvetia canaliculata* (Gorham and Lewey, 1984; Rönnerberg and Ruokolahti, 1986; Yates and Peckol, 1993; Connan et al., 2004; Le Lann et al., 2012a; Parys et al., 2009; Jégou, 2011; Mannino et al., 2014; Heavisides et al., 2018); in winter, as observed for *Dictyopteris polypodioides* (Mannino et al., 2014); or with no seasonal variation, as previously observed for *B. bifurcata* and *Cystoseira baccata* (Le Lann et al., 2012a). As with inter-annual variations, this seasonal variation could result from the seasonal evolution of some biotic and abiotic factors (see previous section), but could also result from their phenology. According to Jégou (2011), phenolic levels can evolve in parallel with the phenology of the species. In our study, *A. esculenta* and *H. elongata* were the only seaweeds with strongly seasonal growth. This agrees with the hypothesis of Jégou (2011) because these two seaweeds had the highest TPC in autumn, which coincided with the regeneration of their thallus. Moreover, *F. serratus*, which has a perennial thallus with slow growth, did not show seasonal variation of TPC. However, this hypothesis was not confirmed for the other perennial seaweeds, *A. nodosum*, *B. bifurcata*, *H. siliquosa*, and *L. ochroleuca*.

Activities of phenolic compounds for their use in cosmetics

Anti-radical, antioxidant, and photoprotective activities were observed for purified fractions from all the brown seaweeds tested with higher activities for the Fucales compared with the Laminariales in line with the TPC. Two Fucales, *A. nodosum* and *F. serratus*, also showed anti-aging activities. Some extracts showed activities close to or sometimes higher than positive controls (commercial molecules).

The highest antioxidant activities were found for fractions of Fucales, especially *A. nodosum*, *F. serratus*, *H. elongata* and *H. siliquosa*. These antioxidant activities were similar to commercial antioxidants used as positive controls (ascorbic acid and BHA). As in our study, Jiménez-Escrig et al. (2001) also found that Fucales had higher radical scavenging activities than Laminariales. Additionally, Le Lann et al. (2016) found an IC₅₀ of 0.020 mg.mL⁻¹ (DPPH assay) for the same ethyl acetate fraction of *H. siliquosa* (harvested in January) which is in accordance with findings from our study (0.014 mg.mL⁻¹ in winter 2017). Concerning the FRAP assay, *H. siliquosa* fractions showed higher activity than other seaweeds: the EC₅₀ was between 0.001 and 0.002 mg.mL⁻¹, meaning it was more active than similar extracts obtained from the same species collected in January (0.058 mg.mL⁻¹) in a previous study (Le Lann et al., 2016). The authors of another study evaluated the radical scavenging activity of flash

chromatography-enriched fractions of *H. elongata* (harvested in spring 2010) and *F. serratus* (harvested in summer 2011) (Heffernan et al., 2015). These last authors found higher radical scavenging activities than we did in our fractions, with an IC₅₀ of 0.014 and 0.019 mg.mL⁻¹, respectively. Indeed, in our study, the activities were 0.050 mg.mL⁻¹ in autumn and 0.056 mg.mL⁻¹ in summer for *H. elongata*; and 0.049 and 0.061 mg.mL⁻¹ in summer 2016 and 2017, respectively, for *F. serratus*. We also found a linear correlation between the TPC and the radical scavenging activity, especially for *H. siliquosa*, as previously observed in other studies (Jiménez-Escrig et al., 2001; Le Lann et al., 2016). However, the relationship between DPPH activity and TPC is not found systematically, indicating the role of other compounds present in the extracts/fractions in the antioxidant activity (Cox et al., 2010).

The difference in observed activity can also be due to the different molecular structures of phlorotannins in the species (Lemesheva and Tarakhovskaya, 2018). Indeed, radical scavenging activity of phlorotannins depends on their structure and the number and location of hydroxyl groups (Agregán et al., 2017). Bogolitsyn et al. (2019) showed a relationship between radical scavenging activity and fractions from *Fucus vesiculosus* enriched in phlorotannins with average molecular weights from 8 to 18 kDa in which the activity decreased with increasing molecular mass.

In our study, the highest photoprotective activity was obtained for two Fucales, *F. serratus* and *H. siliquosa*, with SPF of 4.35 and 3.92, respectively, and PF-UVA of 2.35 and 2.13 respectively. This is the first time that *F. serratus* has shown photoprotective activity. The values obtained for *H. siliquosa* were in accordance with those obtained for the ethyl acetate fraction by Le Lann et al. (2016), with a SPF of 3.55 and a PF-UVA of 2.20. Our values were close to those another solar organic filter like homosalate, which presents a SPF greater than 4 (Couteau et al., 2007). Photoprotective activity of phlorotannins from brown seaweeds has also been demonstrated by *in vivo* tests using embryos of zebrafish (Ko et al., 2011; Cha et al., 2012); those treated with phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* showed a reduction in UV-B damage.

Our enriched fractions of *F. serratus* and *A. nodosum* showed elastase inhibition but the *H. siliquosa* fraction did not. Although the phenolic-enriched fraction of this last species contained a high phenolic content similar to *A. nodosum* and *F. serratus*, it displayed no anti-elastase activity. This is probably due to the types of phenolic compounds differing between the Sargassaceae and Fucaleae, with the first family producing small phenolic compounds (size less than 2 kDa; oligophenols, like diphlorethol) and the second producing large phlorotannins (size over 10 kDa), as already mentioned by Le Lann et al. (2012a). At a higher concentration, the findings from Puspita et

al. (2017) showed elastase inhibition with extracts from another Sargassaceae species from Brittany, *Sargassum muticum*. Indeed, their extract was obtained after enzyme-assisted extractions and exhibited between 21.6% and 32.8% of elastase inhibition at 1 mg.mL⁻¹. The difference between the two Sargassaceae was that *H. siliquosa* has phlorethols as well as fuhalols, while *S. muticum* has only phlorethols (Tanniou et al., 2014; Le Lann et al., 2016). Our results obtained with Fucaleae have nevertheless shown the highest activity with an elastase inhibition of 70.6% and 86.2% at 0.1 mg.mL⁻¹ for *F. serratus* and *A. nodosum* ethyl acetate fractions, respectively. This is the first time that anti-elastase activity has been demonstrated in these species. This activity therefore represents a potential way to valorize those fractions enriched in phenolic compounds for cosmetics with anti-aging potential.

Conclusion

To conclude, the highest TPC was obtained in enriched fractions from Fucales, especially *A. nodosum*, *H. elongata*, *H. siliquosa*, and *F. serratus*. ¹H NMR represents a useful method for profiling phenolic compounds and also for rapidly confirming the presence/absence of molecules. A variability in phenolic content was observed in the first two seaweeds, *A. nodosum* and *H. elongata*, demonstrating variability of phenolic content depending on the time of collection. However, the TPC was very high regardless of the season or year. The season with the highest active phenolic

content can be selected according to the presence of the biomass on the shore: for *A. nodosum* and *F. serratus* at a period when there is less harvesting pressure in Brittany and then in summer after the algae have spawned (winter); for *H. elongata* in autumn; and for *H. siliquosa* in small quantities in spring.

Concerning the associated activities of enriched fractions, higher activities were also obtained for the same four Fucales. Their antioxidant and photoprotective activities were found to be equivalent to several commercial antioxidant molecules and to some synthetic UV filters. These four seaweeds can be valorized as antioxidant fractions for different applications, such as nutrition, nutraceuticals, and cosmetics. Two of the seaweeds, *F. serratus* and *H. siliquosa*, are of greater interest for valorization of their photoprotective fraction in the cosmetics industry. However, anti-aging activity was only found in *A. nodosum* and *F. serratus*. An opportunity may exist to mix some fractions together, with the aim of enlarging the panel of activities of considered species and then proposing a galenic cosmetic with synergetic activities. As an example, a mix of *A. nodosum* and *F. serratus* fractions collected in autumn will permit testing of all the activities. Nevertheless, such a mixture would require testing to avoid antagonistic effects.

Our results suggest that biological activities, especially antioxidant and photoprotective

activities, were due to phenolic compounds and, more precisely, to their chemical structure. As phlorotannins are a complex mixture of polyphloroglucinol molecules, further studies should be carried out to establish potential links between phlorotannin composition and specific activities.

Acknowledgments

This paper is a part of the work carried out by the first author, LG, on the FUI20 applied project RIV-AGE2.0, in which the Laboratory of Marine Environmental Science (LEMAR) set at the IUEM (UBO), is a partner. It is supported by UBO, the Brittany region, the Finistère Department and Brest Métropole.

References

- Abdala-Díaz RT, Cabello-Pasini A, Pérez-Rodríguez E, Conde Álvarez C, Figueroa FL (2006) Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Mar Biol* 148:459–465
- Agregán R, Munekata PE, Domínguez R, Carballo J, Franco D, Lorenzo JM (2017) Proximate composition, phenolic content and *in vitro* antioxidant activity of aqueous extracts of the seaweeds *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata* and *Fucus vesiculosus*. Effect of addition of the extracts on the oxidative stability of canola oil under accelerated storage conditions. *Food Res Int* 99:986–994
- Ar Gall E, Lelchat F, Hupel M, Jégou C, Stiger-Pouvreau V (2015) Extraction and purification of phlorotannins from brown algae. In: Stengel DB, Connan S (ds) *Natural products from marine algae: methods and protocols*. *Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media New York, pp 131–143

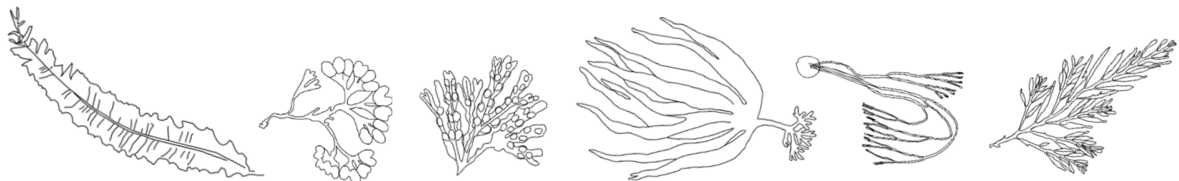
- Bevilacqua S, Savonitto G, Lipizer M, Mancuso P, Ciriaco S, Srijemsi M, Falace A (2019) Climatic anomalies may create a long-lasting ecological phase shift by altering the reproduction of a foundation species. *Ecology* 0:1–4
- Bogolitsyn K, Druzhinina A, Kaplitsin P, Ovchinnikov D, Parshina A, Kuznetsova M (2019) Relationship between radical scavenging activity and polymolecular properties of brown algae polyphenols. *Chem Pap* 73:2377–2385
- Bourgougnon N, Stiger-Pouvreau V (2011) Chapter 4: Chemodiversity and Bioactivity within Red and Brown Macroalgae Along the French coasts, Metropole and Overseas Departements and Territories. In: Kim S-K (ed) *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*. pp. 58-105
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119977087.ch4/summary>
- Bruno de Sousa C, Gangadhar KN, Macridachis J, Pavão M, Morais TR, Campino L, Varela J, Lago JHG (2017) *Cystoseira* algae (Fucaceae): update on their chemical entities and biological activities. *Tetrahedron Asymmetry* 28:1486–1505
- Bunker F, Brodie J, Maggs C, Buker A (2017) *Seaweeds of Britain and Ireland*, 2nd edition. Wild Press Plymouth, UK, 5
- Cabioc’h J, Floc’h J-Y, Le Toquin A, Boudouresque J-F, Meinesz A, Verlaque M (2014) *Algues des mers d’Europe*. Guide Delachaux. Delachaux et Niestlé
- Catarino MD, Silva AMS, Cardoso SM (2017) Fucaceae: A source of bioactive phlorotannins. *Int J Mol Sci* 18:1327
- Cérantola S, Breton F, Ar Gall E, Deslandes E (2006) Co-occurrence and antioxidant activities of fucol and fucophlorethol classes of polymeric phenols in *Fucus spiralis*. *Bot mar* 49:347–351
- Cha SH, Ko CI, Kim D, Jeon YJ (2012) Protective effects of phlorotannins against ultraviolet B radiation in zebrafish (*Danio rerio*). *Vet Dermatol* 23:51–e12
- Clayton MN, Ashburner CM (1994) Secretion of phenolic bodies following fertilisation in *Durvillaea potatorum* (Durvillaeales, Phaeophyta). *Eur J Phycol* 29:1–9
- Connan S, Goulard F, Stiger V, Deslandes E, Ar Gall E (2004) Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Bot Mar* 47:410–416
- Connan S, Delisle F, Deslandes E, Ar Gall E (2006) Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Bot Mar* 49:39–46
- Connan S, Stengel DB (2011) Impacts of ambient salinity and copper on brown algae: 2. Interactive effects on phenolic pool and assessment of metal binding capacity of phlorotannin. *Aquat Toxicol* 104:1–13
- Couteau C, Philippe A, Vibet MA, Papis E, Coiffard L (2018) Study of the influence of substrate and spectrophotometer characteristics on the *in vitro* measurement of sunscreens efficiency. *Eur J Pharm Sci* 121:210–217
- Couteau C, Pommier M, Papis E, Coiffard LJM (2007) Study of the efficacy of 18 sun filters authorized in European Union tested *in vitro*. *Pharmazie* 62:449–452
- Cox S, Abu-Ghannam N, Gupta S (2010) An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *Int Food Res J* 17:205–220
- Ford L, Theodoridou K, Sheldrake GN, Walsh PJ (2019) A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. *Phytochem Anal* 1-13
- Freile-Pelegrín Y, Robledo D (2013) Bioactive Phenolic Compounds from Algae. In: Hernandez-Ledesma B, Herrero M (eds) *Bioactive Compounds from marine foods: plant and animal sources*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 113–129
- Gallon RK, Robuchon M, Leroy B, Le Gall L, Valero M, Feuteun E (2014) Twenty years of observed and predicted changes in subtidal red seaweed

- assemblages along a biogeographical transition zone: Inferring potential causes from environmental data. *J Biogeogr* 41:2293–2306
- Geiselman JA, McConnell OJ (1981) Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: Chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*. *J Chem Ecol* 7:1115–1133
- Generalić Mekinić I, Skroza D, Šimat V, Hamed I, Čagalj M, Popović Perković Z (2019) Phenolic content of brown algae (Phaeophyceae) species: Extraction, identification, and quantification. *Biomolecules* 9:244
- Gorham J, Lewey SA (1984) Seasonal changes in the chemical composition of *Sargassum muticum*. *Mar Biol* 80:103–107
- Heavisides E, Rouger C, Reichel A, Ulrich C, Wenzel-Storjohann A, Sebens S, Tasdemir D (2018) Seasonal variations in the metabolome and bioactivity profile of *Fucus vesiculosus* extracted by an optimised, pressurised liquid extraction protocol. *Mar Drugs* 16:503
- Heffernan N, Brunton NP, FitzGerald RJ, Smyth TJ (2015) Profiling of the molecular weight and structural isomer abundance of macroalgae-derived phlorotannins. *Mar Drugs* 13:509–528
- Imbs TI, Zvyagintseva TN (2018) Phlorotannins are polyphenolic metabolites of brown algae. *Russ J Mar Biol* 44:263–273
- Jégou, C (2011) Etude du genre *Cystoseira* des côtes bretonnes : taxinomie, écologie et caractérisation de substances naturelles. PhD thesis, Université de Bretagne Occidentale, France
- Jennings JG, Steinberg PD (1997) Phlorotannins versus other factors affecting epiphyte abundance on the kelp *Ecklonia radiata*. *Oecologia* 109:461–473
- Jiménez-Escrig A, Jiménez-Jiménez I, Pulido R, Saura-Calixto F (2001) Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *J Sci Food Agric* 81:530–534
- Ko SC, Cha SH, Heo SJ, Lee SH, Kang SM, Jeon YJ (2011) Protective effect of *Ecklonia cava* on UVB-induced oxidative stress: *In vitro* and *in vivo* zebrafish model. *J Appl Phycol* 23:697–708
- Le Lann, K (2009) Etude de la biodiversité des Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) en milieux tempéré et tropical : écologie, chimiotaxonomie et source de composés bioactifs. PhD thesis, Université de Bretagne Occidentale, France
- Le Lann K, Connan S, Stiger-Pouvreau V (2012a) Phenology, TPC and size-fractioning phenolics variability in temperate Sargassaceae (Phaeophyceae, Fucales) from Western Brittany: Native versus introduced species. *Mar Environ Res* 80:1–11
- Le Lann K, Ferret C, Vanmee E, Spagnol C, Lhuillery M, Payri C, Stiger-Pouvreau V (2012b) Total phenolic, size-fractionated phenolics and fucoxanthin content of tropical Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) from the South Pacific Ocean: Spatial and specific variability. *Phycol Res* 60:37–50
- Le Lann K, Surget G, Couteau C, Coiffard L, Cérantola S, Gaillard F, Larnicol M, Zubia M, Guérard F, Poupart N, Stiger-Pouvreau V (2016) Sunscreen, antioxidant, and bactericide capacities of phlorotannins from the brown macroalga *Halidrys siliquosa*. *J Appl Phycol* 28:3547–3559
- Lemesheva V, Tarakhovskaya E (2018) Physiological functions of phlorotannins. *Biol Commun* 63:70–76
- Mannino AM, Vaglica V, Oddo E (2014) Seasonal variation in total phenolic content of *Dictyopteris polypodioides* (Dictyotaceae) and *Cystoseira amentacea* (Sargassaceae) from the Sicilian coast. *Flora Mediterr* 24:39–50
- Parys S, Kehraus S, Pete R, Küpper FC, Glombitza W, König GM (2009) Seasonal variation of polyphenolics in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *Eur J Phycol* 44:331–338
- Pavia H, Cervin G, Lindgren A, Åberg P (1997) Effects of UV-B radiation and simulated herbivory

- on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Mar Ecol Prog Ser* 157:139–146
- Philippe M (2013) Récolte des algues de rive, Guide de bonnes pratiques. Projet Algmarbio, Inter Bio Bretagne
- Plouguerné E, Le Lann K, Connan S, Jechoux G, Deslandes E, Stiger-Pouvreau V (2006) Spatial and seasonal variation in density, reproductive status, length and phenolic content of the invasive brown macroalga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt along the coast of Western Brittany (France). *Aquat Bot* 85:337–344
- Puspita M, Déniel M, Widowati I, Radjasa OK, Douzenel P, Marty C, Bedoux G, Bourgougnon N (2017) Total phenolic content and biological activities of enzymatic extracts from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *J Appl Phycol* 29:2521–2537
- Ragan MA, Jensen A (1978) Quantitative studies on brown algal phenols. II. Seasonal variation in polyphenol content of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. and *Fucus vesiculosus* (L.). *J Exp Mar Bio Ecol* 34:245–258
- Rönnberg O, Ruokolaihti C (1986) Seasonal variation of algal epiphytes and phenolic content of *Fucus vesiculosus* in a northern Baltic archipelago. *Finnish Zool Bot Publ Board* 23:317–323
- Sallenave JM, Xing Z, Simpson AJ, Graham FL, Gaudie J (1998) Adenovirus-mediated expression of an elastase-specific inhibitor (elafin): A comparison of different promoters. *Gene Ther* 5:352–360
- Schoenwaelder MEA, Wiencke C (2000) Phenolic compounds in the embryo development of several Northern Hemisphere fucoids. *Plant Biol* 2:24–33
- Stiger V, Deslandes E, Payri CE (2004) Phenolic contents of two brown algae, *Turbinaria ornata* and *Sargassum mangarevense* on Tahiti (French Polynesia): Interspecific, ontogenic and spatio-temporal variations. *Bot Mar* 47:402–409
- Stiger-Pouvreau V, Jégou C, Cérantola S, Guérard F, Le Lann K (2014) Phlorotannins in Sargassaceae Species from Brittany (France): Interesting molecules for ecophysiological and valorisation purposes. In: Bourgougnon N (ed) *Advances in Botanical Research*, 1st edn. Elsevier, pp 379–411
- Surget G, Stiger-Pouvreau V, Le Lann K, Kervarec N, Couteau C, Coiffard LJM, Gaillard F, Cahier K, Guérard F, Poupart N (2015) Structural elucidation, *in vitro* antioxidant and photoprotective capacities of a purified polyphenolic-enriched fraction from a saltmarsh plant. *J Photochem Photobiol B Biol* 143:52–60
- Svensson CJ, Pavia H, Toth GB (2007) Do plant density, nutrient availability, and herbivore grazing interact to affect phlorotannin plasticity in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Mar Biol* 151:2177–2181
- Swanson AK, Druehl LD (2002) Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquat Bot* 73:241–253
- Tanniou A, Vandanjon L, Incera M, Serrano Léon E, Husa V, Le Grand J, Nicolas JL, Poupart N, Kervarec N, Engelen A, Walsh R, Guérard F, Bourgougnon N, Stiger-Pouvreau V (2014) Assessment of the spatial variability of phenolic contents and associated bioactivities in the invasive alga *Sargassum muticum* sampled along its European range from Norway to Portugal. *J. Appl Phycol* 26:1215–1230
- Thomas NV, Kim SK (2011) Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environ Toxicol Pharmacol* 32:325–335
- Wijesinghe WAJP, Jeon YJ (2011) Biological activities and potential cosmeceutical applications of bioactive components from brown seaweeds: A review. *Phytochem Rev* 10:431–443
- Yates JL, Peckol P (1993) Effects of nutrient availability and herbivory on polyphenolics in the seaweed *Fucus vesiculosus*. *Ecology* 74:1757–1766
- Zubia M, Fabre MS, Kerjean V, Le Lann K, Stiger-Pouvreau V, Fauchon M, Deslandes E (2009) Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chem* 116:693–701



Chapitre 4 : Valorisation des algues en cosmétique : activités anti-âge et stabilité des composés phénoliques



1 Introduction

Selon le règlement cosmétique ([Règlement CE n°1223/2009](#)) et le code de la santé publique (CSP), un produit cosmétique est défini comme « toute substance ou mélange destiné à être mis en contact avec les parties superficielles du corps humain (épiderme, systèmes pileux et capillaire, ongles, lèvres et organes génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles ». Il y aurait 110 milliards d'euros de vente de produits cosmétiques dans le monde par an (<https://www.planetoscope.com/hygiene-beaute/931-ventes-mondiales-de-produits-de-cosmetique.html>). Le marché mondial de ces produits cosmétiques est en croissance rapide et en constante augmentation chaque année ([Figure 4-1](#)).

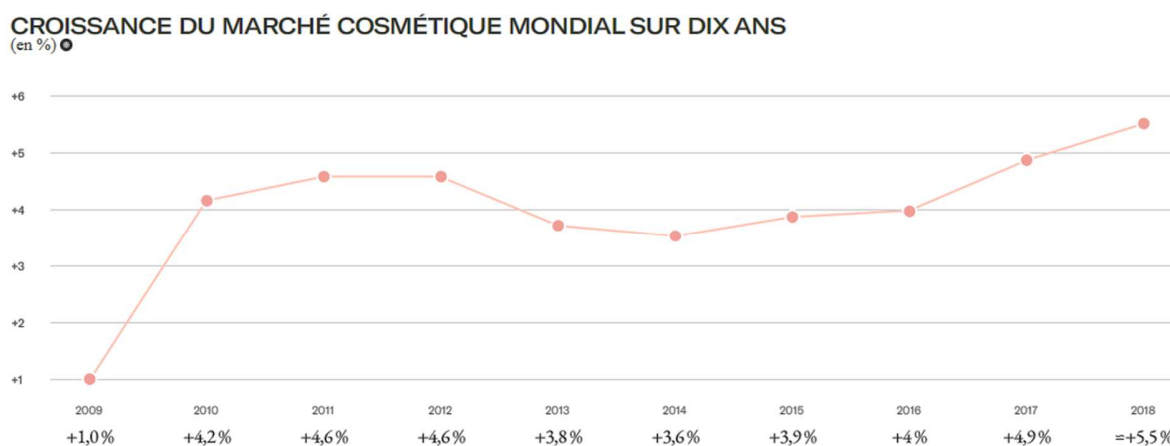


Figure 4-1: Croissance du marché cosmétique mondial entre 2009 et 2018 (Source: <https://www.loreal-finance.com/fr/rapport-annuel-2018/marche-cosmetique-2-1/>).

La répartition du marché mondial s'effectue principalement sur 3 grandes zones géographiques : l'Asie Pacifique, l'Amérique du Nord et l'Europe ([Figure 4-2](#)). L'Europe est le premier marché mondial avec comme part de marché environ 77 milliards d'euros (<https://www.febea.fr/fr/le-secteur-cosmetique/le-secteur-chiffres>). Les dépenses de R&D ont représenté 1,27 milliards d'euros dans l'Union Européenne en 2015 et plus de 26000 scientifiques travaillent pour le secteur cosmétique en Europe (<https://www.semaine-industrie.gouv.fr/decouvrir-industrie/beaute-cosmetique>). Les PME (Petites et Moyennes Entreprises) sont les moteurs clés de l'innovation et de la croissance économique. Plus de 5500 PME participent au processus de fabrication des produits cosmétiques en Europe ([Socio-economic contribution of the european cosmetics industry, 2018](#)). La France est considérée comme un leader mondial de la cosmétique, notamment grâce à L'Oréal, leader mondial des cosmétiques, qui contribuait à 15,3% du marché mondial en 2007. La France est le premier pays exportateur mais producteur.

En 2018, les exportations dépassaient les 14,5 milliards d'euros (<https://www.industries-cosmetiques.fr/le-secteur-cosmetique-francais-affiche-145-milliards-deuros-dexportations-et-confirmeron-role-de-leader-mondial/>). Cette exportation se réalise surtout au sein de l'Union Européenne, en Asie et en Amérique du Nord. Les exportations vers l'Asie croissent de manière très forte avec une augmentation de 16,6% en 2018 avec plus de 20% des produits français qui partent vers ces pays. En termes de production, environ 300 sociétés fabricantes françaises sont retrouvées sur le territoire représentant 55000 emplois directs (<https://www.semaine-industrie.gouv.fr/decouvrir-industrie/beaute-cosmetique>).

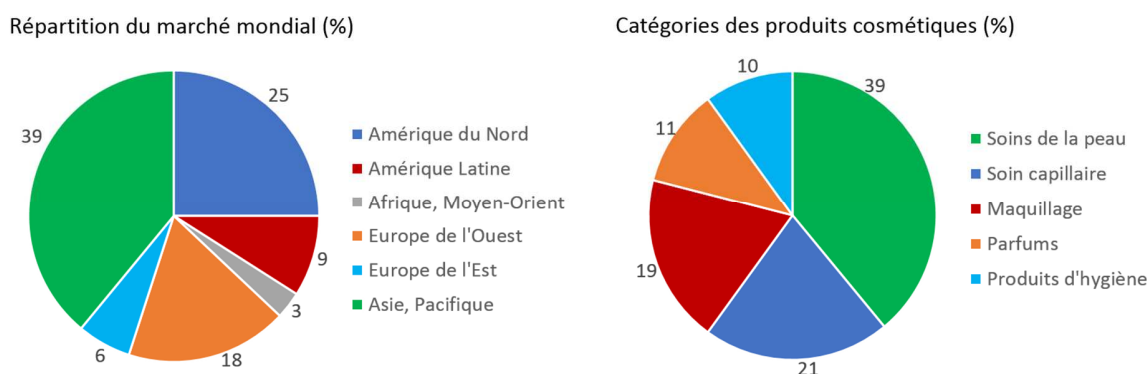


Figure 4-2 : Répartition du marché mondial des produits cosmétiques en 2018 par zones géographiques (à gauche) et par catégories de produits (à droite) (<https://www.loreal-finance.com/fr/rapport-annuel-2018/marche-cosmetique-2-1/>).

Ces produits cosmétiques sont répartis selon différentes catégories : la parfumerie, les produits d'hygiène et de toilette (savons, gels douche, déodorants...), les produits capillaires (shampoings, laques, coloration...) et les produits de la peau et le maquillage (Acar, Com. Pers.). La répartition mondiale du marché s'effectue pour les soins de la peau à hauteur de 39%, suivi par les soins capillaires et le maquillage (Figure 4-2). Les produits de soin et les parfums représentent $\frac{3}{4}$ des exportations françaises à une hauteur de 45% et 22% respectivement. Le marché du soin de la peau est en constante augmentation avec une accélération en 2018 par l'expansion des classes moyennes partout dans le monde et notamment en Asie (<https://www.loreal-finance.com/fr/rapport-annuel-2018/marche-cosmetique-2-1/>). En effet, c'est notamment en Asie Pacifique que la demande est la plus forte car la zone représente près de la moitié du marché du soin en 2018.

Les changements démographiques des populations industrialisées comme les Etats-Unis, l'Europe ou le Japon, sont la conséquence notamment de l'augmentation du nombre de personnes âgées. En France, aujourd'hui près de 22% de la population est âgée de 75 ans et plus (Cosmétique mag, 2018).

Ces personnes sont à la recherche de produits pour préserver leur apparence jeune et leur bonne santé, créant une forte demande de produits de soin spécifiques appelés anti-âge (Clarys & Barel, 2009). En effet, il a été montré que l'achat et l'usage de ce type de produits s'effectue à partir de 35 ans avec 29,5% de la génération X qui en utilise et à partir de 50 ans avec 30,5% de la génération du babyboom (Figure 4-3). L'objectif de ces produits anti-âge est d'effacer les effets de l'âge comme retendre la peau, la lisser ou encore éviter les marques de vieillesse comme les ridules et les taches brunes. A l'heure actuelle, les consommateurs ne sont plus à la recherche des molécules miracles qui effacent les signes du temps mais cherchent l'accompagnement dans des rituels de peau saine (Cosmétique mag, 2018). En parallèle de cette tendance, l'anti-âge fait aussi ses armes avec d'autres segments du marché comme les produits de photoprotection qui sont de plus en plus souvent enrichis d'actifs anti-âge.

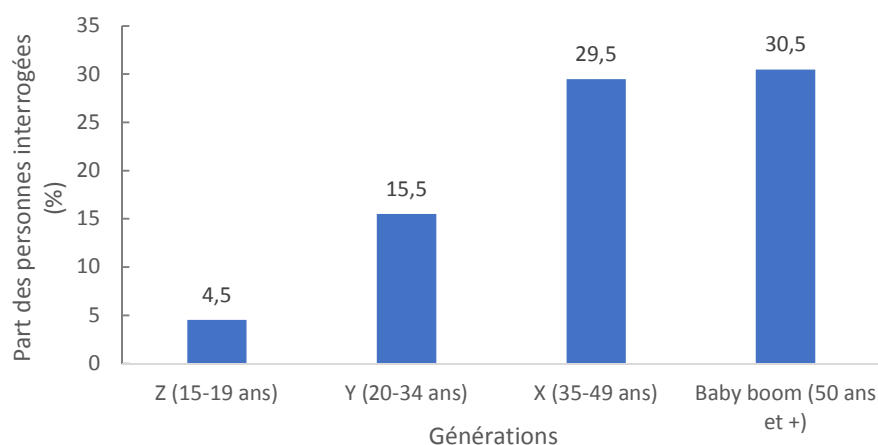


Figure 4-3 : Pourcentage sur l'usage journalier de produits anti-âge selon les générations en 2017, au niveau mondial (<https://fr.statista.com/statistiques/785526/usage-journalier-produits-anti-age-par-generation-monde/>).

Par ailleurs, les soins bios et naturels croissent comme le montre la part des femmes ayant acheté des produits bios en France : de 33% en 2010 à 58% en 2018 (Figure 4-4). De plus, le chiffre d'affaire du secteur des produits naturels et bio augmentent chaque année : de 336 millions d'euros de CA en 2010 à 450 millions en 2015 (Figure 4-4). Naturelle et éco-responsable sont des mots qui traduisent la nouvelle beauté « made in France » (Cosmétique mag, 2018). D'un côté les consommateurs sont à la recherche de produits plus naturels inspirés de la nature qui contiennent des extraits naturels et de l'autre côté ils sont à la recherche d'une sécurité de ces produits par le biais du bio. En effet, selon CosmeticObs, 25% des Européens veulent adopter un mode de vie plus durable, en achetant moins mais mieux, en passant donc par l'achat de produits moins néfastes pour l'environnement et contenant davantage de molécules naturelles (<https://cosmeticobs.com/fr/articles/tendances-cosmetiques-25/la-green-beauty-est-en-marche-4869/>).

Ainsi, la « naturalité » est un axe d'innovation majeur avec l'objectif de créer des filières d'approvisionnement d'ingrédients naturels ainsi qu'une valorisation des circuits courts (<https://www.bpifrance.fr/A-la-une/Actualites/Cosmetique-queelles-sont-les-tendances-de-demain-47326>). D'autre part, une des principales raisons de l'essor des produits bio est la crainte des ingrédients dangereux pour la santé comme les perturbateurs endocriniens ou cancérigènes. Ainsi, les molécules des macroalgues tirent leur épingle du jeu dans la recherche d'actifs plus naturels et non néfastes pour l'environnement en cosmétique.

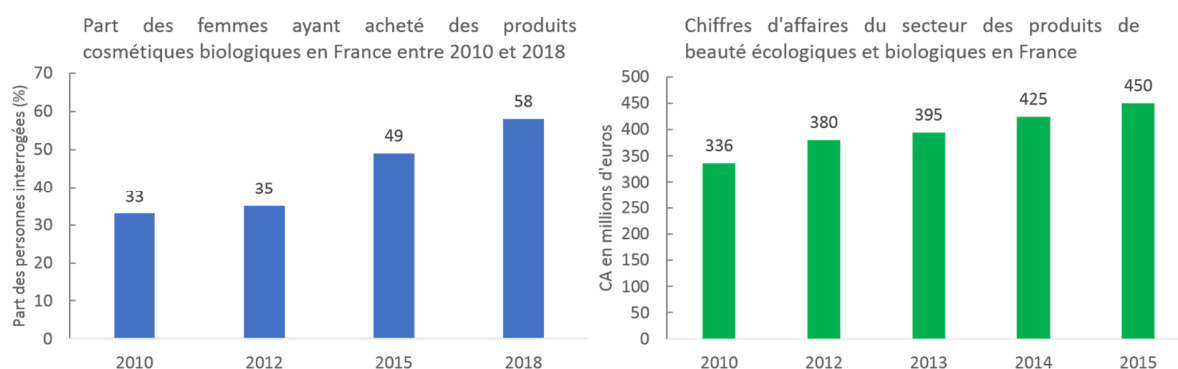


Figure 4-4 : Part des femmes ayant acheté des produits cosmétiques biologiques en France entre 2010 et 2018 (à gauche) et le Chiffre d'affaires (CA) du secteur des produits de beauté écologiques et biologiques en France (<https://fr.statista.com/>).

Il existe des obligations à respecter avant et après la mise sur le marché des produits cosmétiques définies par le [Règlement cosmétique CE n°1223/2009](#) et le code de la santé publique ([ANSM, 2016](#)). Cependant, les produits cosmétiques ne font pas l'objet d'une autorisation de mise sur le marché. En effet, les produits mis sur le marché doivent être garantis par la personne responsable pour leur conformité et leur sûreté pour la santé humaine lorsqu'ils sont utilisés dans des conditions normales. Cette personne responsable doit avoir des diplômes requis établis par le [Règlement CE n°1223/2009](#) et peut être le fabricant des produits, une personne désignée par le fabricant ayant ces diplômes, un importateur qui met le produit sur le marché ou encore le distributeur ([ANSM, 2016](#)). Des contrôles sont effectués par l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) et la DGCCRF (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes) en examinant le dossier d'information du produit (DIP), en effectuant des vérifications physiques ou des contrôles en laboratoire et également la conformité aux principes des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) (conformément à la norme NF EN ISO 22716) ([ANSM, 2016](#)). Pour une mise sur le marché, d'autres exigences sont demandées au niveau de la composition des produits (ingrédients conformes au règlement, interdiction de substances CMR - Carcinogènes, Mutagènes ou toxiques pour la Reproduction -, présence de nanomatériaux), de la

fabrication (respect des BPF), la constitution du DIP, les règles d'étiquetage sur le récipient et l'emballage, la déclaration d'établissement auprès de l'ANSM et la notification à la Commission Européenne (ANSM, 2016). Dans le DIP, un rapport sur la sécurité du produit cosmétique doit être établi. Des données de stabilité du produit cosmétique doivent notamment être fournies, garantissant la qualité du produit cosmétique dans le temps.

Dans ce Chapitre, nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement aux activités anti-âge, domaine en forte croissance dans la cosmétique. Dans la première partie de ce Chapitre, nous avons donc mis au point deux tests enzymatiques pour déterminer l'activité anti-élastase et l'activité anti-tyrosinase des extraits/fractions enrichies en composés phénoliques. Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés à la stabilité de ces composés phénoliques dans les extraits secs mais aussi au sein d'une crème cosmétique, la stabilité des actifs étant une étape indispensable pour pouvoir les valoriser.

2 Des activités anti-âge déterminées par des tests enzymatiques

2.1 Généralités sur la peau

Chez l'humain, la peau est la première couche protectrice contre les agressions extérieures. Elle est divisée en trois couches distinctes : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 4-5).

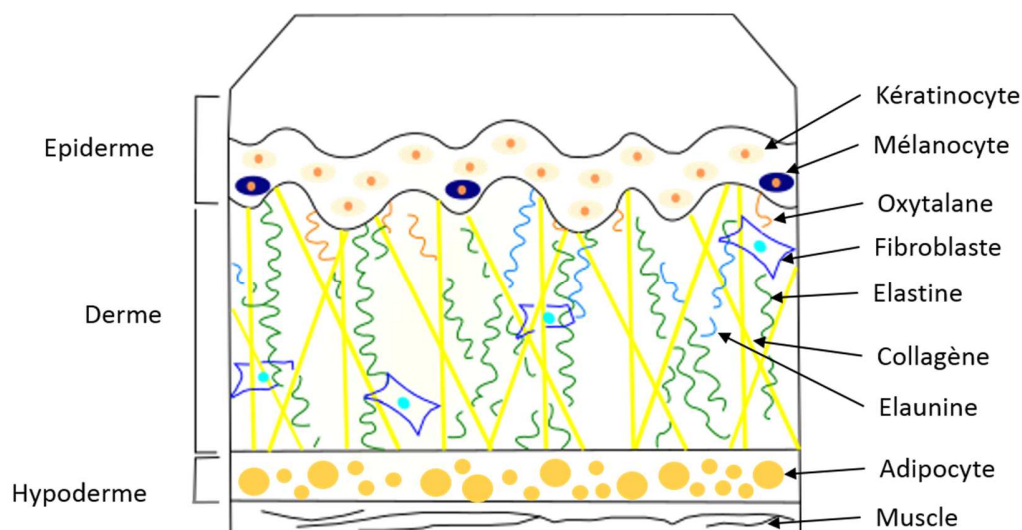


Figure 4-5 : Schéma des différentes couches qui constituent la peau : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (inspiré d'Acar L., Com. Pers.).

L'épiderme ou *Stratum corneum* est constitué à 90% de kératinocytes, produisant de la kératine (protéine fibreuse protégeant la peau des agressions), mais aussi par les mélanocytes, qui produisent la mélanine donnant la couleur à la peau (Acar, Com. Pers.). Le derme est un tissu de soutien qui assure la tonicité et l'élasticité de la peau. Il constitue un tissu conjonctif plus épais que l'épiderme et il est composé de fibroblastes, de fibres et de substance fondamentale (ensemble de protéines formant une sorte de gel où baignent les cellules et les fibres). Il est constitué de trois sortes de fibres élastiques, responsables des propriétés élastiques de la peau : les fibres d'oxytalan, les fibres d'élaunine (immatures) et les fibres élastiques matures faites de fibrilline et d'élastine (Prost-Squarcioni et al., 2008). Ces fibres élastiques sont les principaux constituants de la matrice extracellulaire, appelée aussi ciment intercellulaire. Enfin, l'hypoderme est constitué d'un tissu conjonctif adipeux, composé d'adipocytes, qui a un rôle de réserve de graisse, d'amortisseur contre les chocs et de protection thermique (Prost-Squarcioni et al., 2008).

Le vieillissement de la peau est un processus physiologique normal, principalement caractérisé par la formation de rides, de taches pigmentaires, d'un affaissement ou encore de rugosité de la peau (Imokawa et al., 1995). Ces transformations peuvent s'accélérer suite à différents facteurs, intrinsèques et extrinsèques (Ramos-e-Silva et al., 2013). Intrinsèquement, elles sont produites principalement en raison des effets cumulatifs du stress oxydatif : les radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont

produits pendant le métabolisme cellulaire normal et sont nécessaires aux fonctions biologiques normales. Cependant, des quantités élevées de ROS peuvent causer un stress oxydatif endommageant les protéines de la peau, les lipides et l'ADN des cellules de la peau. Extrinsicement, les transformations de la peau sont dues à des facteurs environnementaux comme l'exposition aux radiations Ultra-Violettes (UV) engendrant la production de radicaux libres (tels que les espèces réactives de l'oxygène, ROS), le stress, les carences nutritionnelles, la consommation d'alcool ou de tabac (Clarys & Barel, 2009).

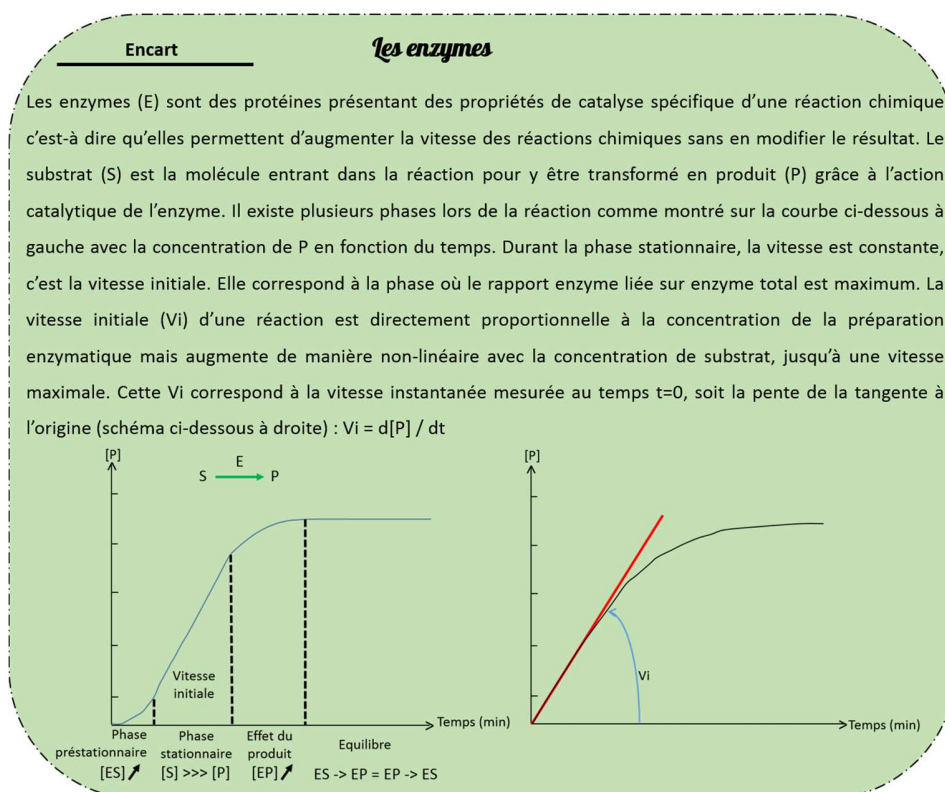
Le derme est un réseau de fibres qui varie de manière complexe avec l'âge notamment par une diminution de la linéarité des fibres élastiques et une diminution de l'élasticité de la peau (Takema et al., 1994 ; Imokawa et al., 1995). A l'âge de 30 ans, les fibres d'oxytalan disparaissent tandis qu'à 40 ans il n'y a plus du tout de fibres d'oxytalan et les fibres d'élaunine commencent à se lyser (Bouissou et al., 1988). C'est l'élastine qui confère l'élasticité aux fibres élastiques. Cependant diverses enzymes (cf Encart Les enzymes) peuvent couper les fibres élastiques, dont l'élastine, c'est le cas notamment de l'élastase. Il existe au moins deux types d'élastase dans la peau, l'élastase neutrophile (EC 3.4.21.37, une protéinase sérine) et l'élastase fibroblastique cutanée (EC 3.4.24., de la famille des métalloprotéinases). Ces deux types d'élastase n'ont pas la même affinité pour les mêmes substrats : la première dégrade tous les types de fibres élastiques matures avec une plus forte affinité pour les fibres d'élaunine tandis que la deuxième dégrade les fibres d'oxytalan et les fibres d'élaunine avec des effets limités sur les fibres élastiques matures (Tsuji et al., 2001).

Les facteurs intrinsèques provoquant le vieillissement de la peau sont responsables de la diminution des fibres d'élaunine et d'oxytalan (Bouissou et al., 1988). D'autre part, Tsuji et al. (2001) ont montré que la dégradation des fibres élastiques provoquant une diminution de l'élasticité de la peau, et donc de l'apparition de rides, serait due à l'augmentation d'élastases fibroblastiques cutanées pouvant être induite par une forte exposition aux radiations UV. En effet, Tsuji et al. (2001) ont montré l'apparition de rides au bout de 6 semaines chez des souris exposées aux radiations UV comparativement à celles non exposées. Tsuji et al. (2001) ont montré que l'inhibition de l'élastase fibroblastique par le NPLT (N-phenetylphosphonyl-leucyl-tryptophane), inhibiteur synthétique d'élastase fibroblastique cutanée, a permis une diminution de la formation des rides après 18 semaines d'exposition aux radiations UV permettant de maintenir un réseau de fibres élastiques variées dans le derme. Inhiber l'élastase permettrait ainsi de maintenir l'élasticité de la peau et de diminuer les effets visibles du vieillissement de la peau. C'est par exemple le cas de Berkemyol[®] cacao de Berkem (France, <http://www.berkem.com/fr/>), un actif cosmétique composé de polyphénols estérifiés extraits de fèves de cacao, qui renforce le réseau élastique et donc l'élasticité de la peau en inhibant l'activité de l'élastase. L'entreprise BiotechMarine

(SEPPIC, France ; <https://www.seppic.com/seppic/biotechmarine>) commercialise également des actifs issus d'algues tels que Kalpariane™ AD issu d'*Alaria esculenta* en proposant une augmentation de fermeté de la peau due à son activité anti-élastase.

Le vieillissement de la peau entraîne également l'apparition de taches pigmentaires. La mélanine, le pigment principal responsable de la pigmentation de la peau, des cheveux et des yeux chez l'homme, est produit par les mélanocytes grâce à la mélanogénèse. Ce processus de mélanogénèse est très complexe et est représenté par de nombreuses réactions enzymatiques et chimiques. La tyrosinase (EC 1.14.18.1), une enzyme oxydasique, a un rôle prépondérant dans la synthèse de cette mélanine : l'enzyme catalyse l'oxydation de la L-tyrosine en 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ainsi que le L-DOPA en dopaquinone dans la synthèse de la mélanine (Körner & Pawelek 1982 ; Zolghadri et al., 2018). Inhiber la tyrosinase permet de bloquer/inhiber ces réactions amenant à la production de la mélanine qui colore la peau, agissant ainsi comme agent blanchissant.

Dans cette première partie du Chapitre 4, la mise au point de deux méthodes *in vitro* pour déterminer l'activité anti-âge d'extraits/fractions d'algues est présentée : les activités anti-élastase et anti-tyrosinase.



2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Activité anti-élastase

2.2.1.1 Principe

Le principe de ce test consiste en la transformation du N-succinyl-ALA-ALA-ALA-*p*-nitroanilide (SucAla₃PNA) en N-succinyl-ALA-ALA-ALA (SucAla₃) grâce à une hydrolyse enzymatique, utilisant l'élastase selon la réaction suivante :



avec PNA = *p*-nitroanilide.

L'objectif est de tester l'activité inhibitrice de nos extraits/fractions d'algues sur l'enzyme afin de limiter la libération de PNA, qui produit une couleur jaune et peut être mesurée par spectrophotométrie à 410 nm. Une perte de la couleur amenant donc à une diminution de la DO révèle une activité anti-élastase.

2.2.1.2 Produits et extraits d'algues

Le substrat SucAla₃PNA et l'enzyme élastase provenant de pancréas de porc (EC 3.4.21.36) sont des produits Sigma-Aldrich S4760 et E1250 respectivement. Nous avons utilisé comme témoin positif, l'épigallocatechine gallate (EGCG) (Sigma-Aldrich, E4143). Le sulfate de cuivre a également été testé comme par [Sundaram et al. \(2018\)](#), mais sans résultat concluant. Les extraits d'algues analysés ont été obtenus soit par macération classique solide/liquide, soit par ASE sur la plateforme BIODIMAR (cf. Chapitre 2, page 104) à partir de trois macroalgues brunes d'intérêt, *Ascophyllum nodosum* (An), *Fucus serratus* (Fs) et *Halidrys siliquosa* (Hs). Les extraits bruts ont été dilués dans un mélange eau:éthanol à 20:80 (v:v) permettant une meilleure solubilisation de l'extrait. Un essai de filtration de l'extrait ASE d'*A. nodosum* (An 1CR75, cf Chapitre 2, page 102), qui n'était pas limpide, a été mené à l'aide d'un filtre seringue de porosité 0,2 µm (FisherBrand™, Fisher Scientific™, Etats-Unis).

2.2.1.3 Optimisation du protocole

Une optimisation du protocole du test anti-élastase a été mise en place ([Sigma-Aldrich, <https://www.sigmaaldrich.com/>](#) ; [Sallenave et al., 1998](#)). Pour cela, différents volumes et concentrations des réactifs, différents temps d'incubation et des mesures spectrophotométriques à 410 nm soit en point final soit en cinétique ont été testés et sont représentés dans le [Tableau 4-1](#). Dans un premier temps, tous les réactifs sauf l'enzyme ont été déposés à température ambiante sur une microplaque 96 puits (volumes dans le [Tableau 4-2](#) pour le protocole n°1).

Tableau 4-1 : Les cinq différents protocoles testés lors de l'optimisation du test anti-élastase : différents ordres de dépôts (représenté par les numéros au début de chaque produit), différents volumes ou concentrations, différents temps et température d'incubation, différentes lectures (point final ou cinétique) au spectrophotomètre. T10= 10 minutes après T0.

	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5
Echantillon	1_ 13 µL	1_ 15 µL	1_ 13 µL	1_ 13 µL	1_ 13 µL
Tampon Tris-HCl = réactif A	2_ 164 µL à 100 mM	3_ 167 µL à 100 mM	2_ 164 µL à 100 mM	2_ 164 µL à 100 mM	2_ 93 µL à 179 mM
SucAla3-PNA = réactif B	3_ 13 µL à 4,4 mM	5_ 13 µL à 4,4 mM	3_ 13 µL à 2,2 ; 4,4 ; 6,6 ou 8,8 mM	3_ 13 µL à 6,6 mM	3_ 52 µL à 1,65 mM
Elastase = réactif C	4_ 7 µL à 0,5 U.mL ⁻¹	2_ 5 µL à 0,5 U.mL ⁻¹	5_ 7 µL à 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ou 4,0 U.mL ⁻¹	5_ 7 µL à 2,0 U.mL ⁻¹	5_ 42 µL à 0,34 U.mL ⁻¹
Autre		4_ Incubation 20 min à température ambiante	4_ Incubation 20 min à 25°C	4_ Incubation 20 min à 25°C	4_ Incubation 5 min à 25°C
Lecture	DO à 410 nm à T0 et T10	DO à 410 nm à T0 et T10	Cinétique de 30 min à 410 nm	Cinétique de 3 min à 410 nm	Cinétique de 3 min à 410 nm

L'enzyme, maintenue sur de la glace, a été déposée au dernier moment. Le contrôle positif permet de vérifier que l'enzyme est active et le contrôle négatif, à l'inverse, permet de vérifier qu'il n'y a pas d'activité élastase sans l'enzyme. Un blanc échantillon/témoin positif a également été effectué pour enlever le biais possible de l'absorption de l'extrait/témoin positif à la longueur d'onde utilisée. La lecture de la DO a été réalisée en point final à 410 nm au début et à 10 après le lancement de la réaction (T0 et T10). A T10, le calcul du pourcentage d'inhibition a été réalisé en déduisant la DO du T0 de la DO du T10 :

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times \frac{DO_{CTRL}(T10-T0) - DO_{ECH}(T10-T0)}{DO_{CTRL}(T10-T0)} \quad (\text{Equation 1})$$

Avec DO_{CTRL} la DO du contrôle obtenue à T0 et à T10, DO_{ECH} la DO de l'échantillon (extrait, fraction ou témoin positif) obtenue à T0 et T10.

Tableau 4-2 : Volumes des différents réactifs (en μL) du test anti-élastase du protocole n°1 pour les différents échantillons.

	Réactif A	Réactif B	Réactif C	Echantillon/témoin positif
Contrôle positif	177	13	7	0
Contrôle négatif	184	13	0	0
Echantillon/témoin positif	164	13	7	13
Blanc échantillon/témoin positif	184	0	0	13

Pour le protocole n°2, le dépôt de l'ordre des réactifs a été changé selon l'article de [Sundaram et al. \(2018\)](#) et une étape supplémentaire a été rajoutée : une incubation de 20 min à température ambiante. L'enzyme et l'échantillon ont été d'abord incubés puis les autres réactifs rajoutés. Les résultats des protocoles n°1 et 2 ne sont pas montrés dans cette étude.

Pour le protocole n°3, l'ordre des réactifs a été rétabli comme pour le protocole n°1 avec une phase d'incubation laissée avant de déposer l'enzyme, cette fois-ci à 25°C. Pour ce protocole, ce n'est plus une mesure en point final mais une cinétique de 30 min qui a été mise en place. Ainsi, nous n'obtenons plus le pourcentage d'inhibition par la soustraction de la DO à T0 à celle obtenue à T10 mais avec les vitesses initiales (V_i) correspondant au coefficient directeur de la tangente à l'origine :

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times \frac{V_{iCTRL} - V_{iECH}}{V_{iCTRL}} \quad (\text{Equation 2})$$

Avec V_{iCTRL} , la vitesse initiale obtenue pour le contrôle positif et V_{iECH} , la vitesse initiale obtenue pour l'échantillon (extrait, fraction ou témoin positif).

Différentes concentrations de substrat ont été testées avec le protocole n°3 : 2,2 ; 4,4 ; 6,6 et 8,8 mM dans l'optique d'obtenir une concentration saturante en substrat. Différentes concentrations d'enzyme ont également été testées comme suit : 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 3,0 et 4,0 U.mL⁻¹.

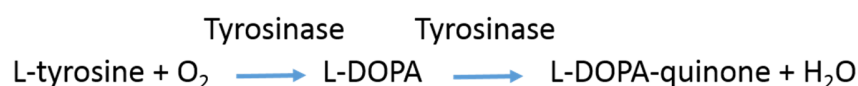
Le protocole n°4 correspond au protocole n°3 avec les concentrations optimisées en substrat et enzyme ainsi qu'une modification du temps de la cinétique (3 min au lieu de 30 min).

Le protocole n°5 correspond au protocole n°4 mais en augmentant les volumes du substrat et de l'enzyme et en diminuant celui du tampon phosphate tout en gardant la concentration finale des réactifs (d'où une diminution pour le substrat et l'enzyme et une augmentation pour le tampon phosphate de leurs concentrations initiales).

2.2.2 Activité anti-tyrosinase

2.2.2.1 Principe

La L-tyrosine est transformée en L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) par une oxydation et la L-DOPA est ensuite hydrolysée en L-DOPA-quinone. Ces deux réactions se réalisent grâce à la présence de tyrosinase :



L'objectif est de tester l'activité inhibitrice de nos extraits/fractions d'algues sur l'enzyme afin de limiter l'étape d'oxydation de la L-tyrosine en L-DOPA-quinone. Pour cela, un suivi d'une mesure à une longueur d'onde de 475 nm peut être mené, longueur d'onde d'absorption de la quinone. Une perte de la couleur amenant donc à une diminution de la DO révèle une activité anti-tyrosinase.

2.2.2.2 Produits et extraits d'algues

Tous les produits viennent de Sigma-Aldrich : le substrat L-tyrosine (T3754), l'enzyme tyrosinase (T3824-25 KU) et le témoin positif, l'acide kojique (K3125). Les extraits et fractions d'algues sont les mêmes que ceux utilisés lors de l'optimisation du test anti-élastase (cf. page 244) : soit obtenus par macération classique solide/liquide, soit par ASE sur la plateforme BIODIMAR (cf. Chapitre 2, page 103) à partir de trois macroalgues brunes d'intérêt, *Ascophyllum nodosum* (An), *Fucus serratus* (Fs) et *Halidrys siliquosa* (Hs). Ils ont été testés à des concentrations différentes entre 0,05 et 10 mg.mL⁻¹.

2.2.2.3 Optimisation du protocole

De la même manière que pour le test anti-élastase, des modifications du protocole anti-tyrosinase de [Chan et al. \(2008\)](#) et [Lim et al. \(2009\)](#) ont été réalisées à différents niveaux dans le but de l'optimiser ([Tableau 4-3](#)).

Tableau 4-3 : Les cinq différents protocoles testés lors de l'optimisation du test anti-tyrosinase : différents ordres de dépôts (représenté par les numéros au début de chaque produit), différents volumes ou concentrations, différents temps et température d'incubation, différentes lectures (point final ou cinétique) au spectrophotomètre. Le réactif A correspond au tampon phosphate.

	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5
Echantillon	1_ 13 µL	1_ 13 µL	1_ 13 µL	1_ 13 µL	1_ 20 µL
L-Tyrosine = réactif B	2_ 180 µL à 1,0 mM	4_ 180 µL à 1,0 mM	2_ 180 µL à 0,5 ; 1,0 ou 1,5 mM	2_ 180 µL à 1,5 mM	2_ 243 µL à 1,694 mM
Tyrosinase = réactif C	3_ 7 µL à 1000 U.mL ⁻¹	2_ 7 µL à 1000 U.mL ⁻¹	4_ 7 µL à 250, 500, 750, 1000 ou 1500 U.mL ⁻¹	4_ 7 µL à 1250 U.mL ⁻¹	4_ 42 µL à 317,71 U.mL ⁻¹
Autre	4_ Incubation 20 min à température ambiante	3_ Incubation 10 min à température ambiante 5_ Incubation 20 min à température ambiante	3_ Incubation 20 min à 25°C	3_ Incubation 20 min à 25°C	3_ Incubation 5 min à 25°C
Lecture	DO en point final à 475 nm à 20 min	DO en point final à 475 nm à 20 min	Cinétique de 60 min à 475 nm	Cinétique de 5 min à 475 nm	Cinétique de 5 min à 475 nm

Le premier protocole a consisté à incuber tous les réactifs dans les puits d'une microplaque à 96 puits pendant 20 min. Au bout de ces 20 min, la DO en point final a été lue à 475 nm. Le calcul du pourcentage d'inhibition a été réalisé en déduisant la DO du T0 de la DO du T10 comme pour le test anti-élastase. Des contrôles positif et négatif ainsi qu'un blanc échantillon ont été également effectués comme pour le test anti-élastase.

Pour le protocole n°2, l'ordre du dépôt des réactifs a été modifié avec deux étapes supplémentaires d'incubation : l'échantillon et l'enzyme ont été incubés dans un premier temps pendant 10 min à température ambiante. Ensuite, le substrat a été rajouté et de nouveau le mélange a été mis à incuber pendant 20 min à température ambiante. Au bout de ces 20 min, la DO a été lue en point final à 475 nm. De la même manière que pour le test anti-élastase, les résultats des protocoles n°1 et 2 ne seront pas montrés.

Pour le protocole n°3, l'ordre de dépôt des réactifs a été rétabli à celui du protocole n°1 mais avec une étape d'incubation pendant 20 min à 25°C avant de déposer l'enzyme. Dès le dépôt de l'enzyme, une cinétique de 60 min a été réalisée à 475 nm. Le pourcentage d'inhibition a été obtenu à partir de ce protocole avec le calcul de la vitesse initiale (cf équation 2, test anti-élastase, page 246). Différentes concentrations de substrat ainsi que d'enzymes ont été testées avec le protocole n°3 : 0,5 ; 1,0 et 1,5 mM pour le substrat et 250, 500, 750, 1000 et 1250 U.mL⁻¹ pour l'enzyme.

Le protocole n°4 correspond au protocole n°3 après l'optimisation des concentrations en substrat et enzyme effectuée.

Le protocole n°5 correspond au protocole n°4 mais en augmentant les volumes tout en gardant la même concentration finale des réactifs (d'où une diminution de leurs concentrations initiales).

2.3 Résultats et discussions

2.3.1 Test de l'activité anti-élastase

2.3.1.1 Optimisation de la concentration en enzyme et en substrat

Les mesures de l'absorbance, c'est-à-dire les mesures de l'apparition du produit en fonction du temps, ont été différentes pour chaque concentration d'enzyme (élastase) testée : plus la concentration en enzyme était importante, plus l'absorbance était élevée (Figure 4-6). Cela s'explique puisque, plus il y a d'enzyme, plus il y a de libération du produit de la réaction que catalyse l'enzyme. En augmentant la concentration en enzyme avec une concentration de substrat à 4,4 mM, la vitesse initiale est également plus grande que lorsque la concentration de l'enzyme est petite. Pour rappel, la vitesse initiale (V_i) correspond au coefficient directeur de la droite à la tangente tracée sur la courbe de la cinétique obtenue : augmentation de la V_i de $0,005 \text{ min}^{-1}$ à une concentration d'enzyme de $0,5 \text{ U.mL}^{-1}$ jusqu'à une V_i de $0,092 \text{ min}^{-1}$ à une concentration d'enzyme de $4,0 \text{ U.mL}^{-1}$. La différence d'absorbance est faible entre $0,5$ et $1,0 \text{ U.mL}^{-1}$ et devient plus significatif à partir de $2,0 \text{ U.mL}^{-1}$. Il aurait été possible de choisir la concentration de $4,0 \text{ U.mL}^{-1}$, cependant l'enzyme ayant un coût élevé, il a été donc préférable de faire un compromis avec la concentration de $2,0 \text{ U.mL}^{-1}$ ($V_i = 0,038 \text{ min}^{-1}$).

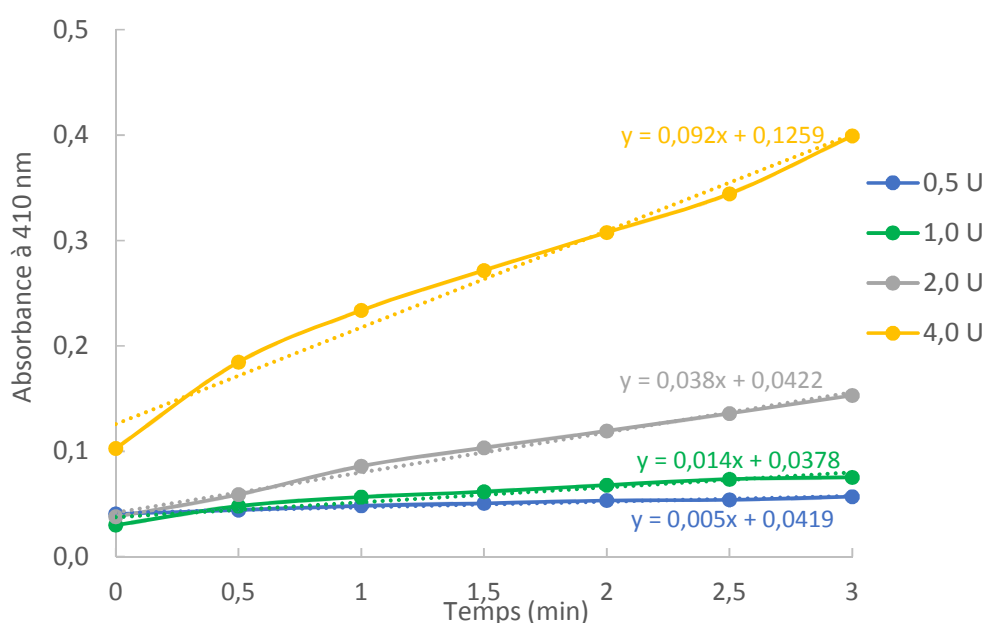


Figure 4-6 : Cinétiques de l'absorbance à 410 nm obtenues avec différentes concentrations d'enzyme (élastase ; 0,5 ; 1,0 ; 2,0 et 4,0 U.mL^{-1}) et une concentration de substrat de 4,4 mM lors du test anti-élastase (protocole n°3). Les courbes de tendance correspondant aux courbes à la tangente sont également représentées avec les équations respectives.

Différentes concentrations de substrat ont également été testées avec une concentration d'enzyme à $2,0 \text{ U.mL}^{-1}$. Les mesures d'absorbance et donc d'apparition du produit en fonction du temps ont été différentes pour chaque concentration de substrat testées, comme pour l'enzyme (Figure 4-7). Lorsque la concentration en substrat augmente, la vitesse initiale augmente également : V_i de $0,049 \text{ min}^{-1}$ avec une concentration de $2,2 \text{ mM}$ jusqu'à une V_i de $0,205 \text{ min}^{-1}$ avec une concentration de $8,8 \text{ mM}$. A $8,8 \text{ mM}$, concentration la plus élevée que nous ayons testée, la saturation en substrat n'a pas encore été établie (données non montrées), cependant le coût du substrat étant élevé et comme la courbe entre 0 et 3 min n'est pas linéaire à $8,8 \text{ mM}$, la concentration à $6,6 \text{ mM}$ apparaît être un bon compromis ($V_i = 0,146 \text{ min}^{-1}$).

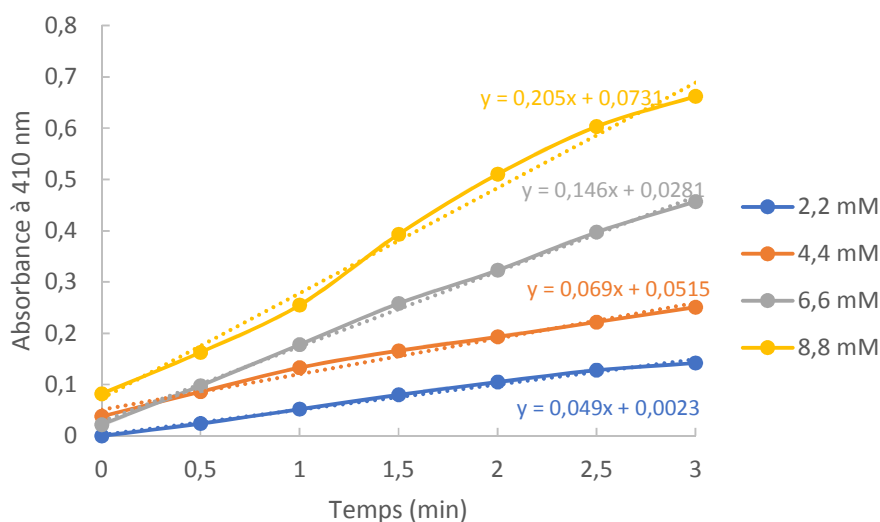


Figure 4-7 : Cinétiques de l'absorbance à 410 nm obtenues avec différentes concentrations de substrat (2,2 ; 4,4 ; 6,6 et 8,8 mM) et une concentration en enzyme de $2,0 \text{ U.mL}^{-1}$, lors du test anti-élastase (protocole n°3). Les courbes de tendance correspondant aux courbes à la tangente sont également représentées avec les équations respectives.

2.3.1.2 Mise en place du protocole final

L'élastase ne nécessite pas d'activateurs spécifiques ; néanmoins, la présence de tampon Tris stimule son activité (Hartley & Shotto, 1971). Le pH optimum de l'élastase est de 8,0-8,5, nous avons donc maintenu le tampon à ce pH (Sigma-Aldrich, <https://www.sigmaaldrich.com/>). Différentes températures d'incubation ont été testées, à température ambiante ou à 25°C . Nous avons opté pour une incubation à température de 25°C plutôt qu'à température ambiante puisque nous avons obtenu des DO plus élevées à 25°C ainsi qu'une cinétique plus « linéaire » avec moins d'artéfacts (données non montrées). Cette température est utilisée dans plusieurs études comme Gertler & Hofmann (1970) et Kim et al. (2009). Cependant, cette température de réaction varie selon d'autres études, comme Sundaram et al. (2018) qui ont réalisés l'incubation à température ambiante. Le protocole utilisé par Sigma pour une digestion d'enzyme préconise une température à 37°C (Sigma e0127). Lamy & Tauber (1963), Tsuji et al. (2001) et

Jdey (2017) ont également mené leurs expériences à 37°C. La température étant un facteur très important pour l'action de l'enzyme, il serait intéressant de mener les expériences à 37°C pour observer s'il existe une différence sur l'activité anti-élastase entre 37° et 25°C.

La réaction peut être lancée en ajoutant au dernier moment soit le substrat, soit l'enzyme. Tsuji et al. (2001), Kim et al. (2009), Jdey (2017) et Sundaram et al. (2018) ont opté pour laisser incuber l'enzyme avec l'extrait et terminer par l'ajout de substrat afin de démarrer la réaction. Dans notre étude, nous avons testé les deux avec l'ajout du substrat à la fin pour le protocole n°2 et l'ajout de l'enzyme à la fin pour les autres protocoles. Lors de l'expérience avec l'ajout du substrat à la fin, nous avons obtenu des cinétiques avec des points qui ne se suivaient pas de manière cohérente et n'étaient pas stables. Nous sommes donc revenus sur la réaction avec l'enzyme à la fin comme dans l'étude d'Azmi et al. (2014). Nous avons également montré que la cinétique était plus adaptée pour le suivi d'une réaction enzymatique qu'une lecture de DO en point final, nous permettant ainsi de calculer les vitesses initiales des réactions et calculer le pourcentage d'inhibition de l'enzyme. De plus, la cinétique permet d'avoir un suivi tout le long de la réaction et déceler des problèmes d'action de l'enzyme ou du substrat par exemple.

Enfin, pour pouvoir déposer des volumes plus élevés d'enzyme pour permettre une meilleure précision du test, les volumes ont été augmentés lors du protocole n°5 en diminuant donc les concentrations initiales pour garder les mêmes concentrations finales de chaque produit. Ce protocole correspond donc au protocole final validé et représenté dans le [Tableau 4-4](#) ci-dessous. Le tampon Tris-HCl a été préparé à une concentration de 179 mM ajusté à pH 8. Pour cela 1,083 g de Tris-HCl a été dissout dans 500 mL d'eau distillée. Pour une solution à 1,65 mM, 33,36 mg de SucAla₃PNA ont été mélangés à 44,48 mL de tampon Tris-HCl. L'élastase préparée à 0,34 U.mL⁻¹ a été diluée dans le tampon Tris-HCl. Le témoin positif, EGCG, a été préparé dans de l'eau distillée. La vitesse initiale correspond au coefficient directeur de la tangente, calculée entre **0 et 192 s**, en traçant l'absorbance en fonction du temps (mesures d'absorbance toutes les 48 s). Le pourcentage d'inhibition a ainsi été calculé en utilisant l'équation 2 ci-dessus.

Tableau 4-4: Protocole final du test anti-élastase.

Produits	Concentration	Volume (µL)
Echantillon/Témoin	x mg.mL ⁻¹	13
Tampon Tris-HCl = réactif A	179 mM	93
Substrat SucAla3-PNA = réactif B	1,65 mM	52
Incubation 5 min à 25°C dans le spectrophotomètre		
Enzyme Elastase = Réactif C	0,34 U.mL ⁻¹	42
Cinétique de 3 min (192 sec) à 410nm		

2.3.1.3 Activité anti-élastase d'extraits d'algues brunes

En utilisant le protocole final optimisé, les extraits bruts des 3 algues brunes ont montré une activité inhibitrice de l'élastase (Figure 4-8). Ils ont été obtenus par macération (MAC) ou extraction accélérée par solvant (ASE) à partir d'*Ascophyllum nodosum*, *Fucus serratus* et *Halidrys siliquosa*. Les extraits des deux Fucaceae, *A. nodosum* et *F. serratus*, ont présenté une inhibition de l'enzyme à de plus forts pourcentages comparativement à la Sargassaceae (*H. siliquosa*) quelque soit le type d'extraction. En effet, les extraits MAC d'*A. nodosum* et *F. serratus* à 1 et 2 mg.mL⁻¹ ont inhibé au minimum à 60% l'élastase tandis que l'extrait d'*H. siliquosa* ne dépasse pas les 40% (Figure 4-8A). Cependant, le pourcentage d'inhibition obtenu avec un extrait à 0,1 mg.mL⁻¹ est similaire entre les 3 algues avec 7,4, 8,5 et 7,8% d'inhibition pour *A. nodosum*, *F. serratus* et *H. siliquosa* respectivement.

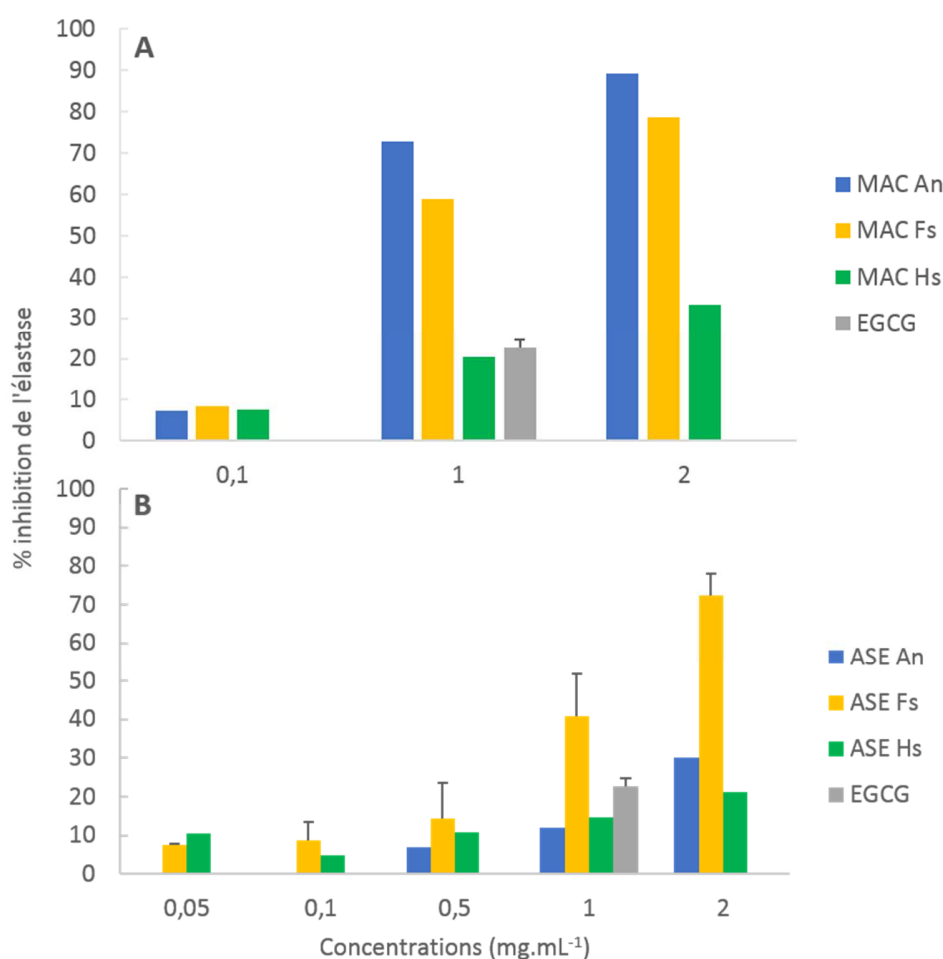


Figure 4-8 : Pourcentage d'inhibition de l'élastase par des extraits bruts d'*Ascophyllum nodosum* (An), *Fucus serratus* (Fs) et *Halidrys siliquosa* (Hs) obtenus par macération (A) ou par extraction accélérée par solvant ASE (B), à différentes concentrations (mg.mL⁻¹). L'activité de l'EGCG a seulement été obtenue pour la concentration 1 mg.mL⁻¹. Seule la fraction ASE Fs et l'EGCG ont été réalisés avec n=3, les autres fractions à n=1.

Les activités anti-élastase des extraits ASE de *F. serratus* et d'*H. siliquosa* (Figure 4-8B) ont obtenu la même tendance que les extraits obtenus par macération avec un léger pourcentage d'inhibition supérieur avec les extraits à 2 mg.mL⁻¹ obtenus par macération : 72,2 et 78,7% d'inhibition de l'élastase pour les extraits ASE et macération respectivement à partir de *F. serratus* et 21,3 et 33,2% pour les extraits ASE et macération respectivement à partir d'*H. siliquosa*. Il existe une différence plus marquée concernant les deux extraits d'*A. nodosum* : l'extrait obtenu par macération a présenté une activité anti-élastase plus élevée que l'extrait obtenu par ASE. En effet, les pourcentages d'inhibition calculés pour les extraits MAC et ASE sont de 72,9% et 12,0% à 1 mg.mL⁻¹ respectivement et de 89,4 et 30,1% à 2 mg.mL⁻¹ respectivement. Enfin, trois extraits ont montré des teneurs d'inhibition de l'élastase supérieures au témoin positif (EGCG) inhibant l'élastase à 22,8% pour une concentration de 1 mg.mL⁻¹ : les extraits MAC d'*A. nodosum* et *F. serratus* ainsi que l'extrait ASE de *F. serratus*. Dans le Chapitre 3 (cf page 225), des fractions enrichies ont été testées avec une activité montrée à un pourcentage d'inhibition de l'élastase de 20,4 et 70,6% pour *A. nodosum* et 70,5 et 85,2% pour *F. serratus* à 0,05 et 0,1 mg.mL⁻¹ respectivement mais aucune activité détectée pour *H. siliquosa*. Ainsi, nous obtenons des activités anti-élastase beaucoup plus importantes avec les fractions purifiées en CP que les extraits bruts suggérant la propriété anti-élastase principalement due aux phlorotannins, pour *A. nodosum* et *F. serratus*. Cependant, il semblerait que les phlorotannins de la Sargassaceae, *H. siliquosa*, ne présentent pas cette activité.

L'activité enzymatique peut parfois être perturbée si l'extrait n'est pas limpide avec la présence de petites particules. Nous avons donc réalisé un test de filtration à l'aide d'un filtre seringue (pores de 0,2 µm) sur un extrait ASE d'*A. nodosum* obtenu avec 1 cycle (cellule retournée) à 75°C (An 1CR75, cf Chapitre 2, page 102). Pour la même concentration, 2 mg.mL⁻¹, l'extrait non filtré a inhibé à 93,1 % l'élastase tandis que l'extrait filtré a inhibé à 33,3% l'enzyme. La filtration ne permet donc pas d'obtenir des résultats optimaux pour l'activité anti-élastase, peut-être due à l'élimination des composés par la filtration.

2.3.2 Test de l'activité anti-tyrosinase

2.3.2.1 Optimisation de la concentration en enzyme et en substrat

Les mesures d'absorbance correspondant à l'apparition du produit en fonction du temps ont été différentes pour chaque concentration d'enzymes testée (250, 500, 750, 1000 et 1250 U.mL⁻¹) pour le test anti-tyrosinase, avec une concentration de substrat de 1,0 mM. Plus la concentration en enzyme est importante, plus la DO est élevée, sauf pour la concentration d'enzyme à 1000 U.mL⁻¹ (Figure 4-9). Les résultats ont montré une différence de DO marquée entre le test anti-tyrosinase effectué avec la concentration d'enzyme à 1250 U.mL⁻¹ par rapport aux 4 autres concentrations. La concentration à 1250 U.mL⁻¹ permet d'obtenir une vitesse initiale plus élevée et donc des calculs plus précis de pourcentage d'inhibition. Pour rappel, la vitesse initiale (Vi) correspond au coefficient directeur de la droite à la tangente tracée sur la courbe de la cinétique obtenue : augmentation de la Vi de 0,001 min⁻¹ à une concentration d'enzyme de 250 U.mL⁻¹ jusqu'à une Vi de 0,012 min⁻¹ à une concentration d'enzyme de 1250 U.mL⁻¹.

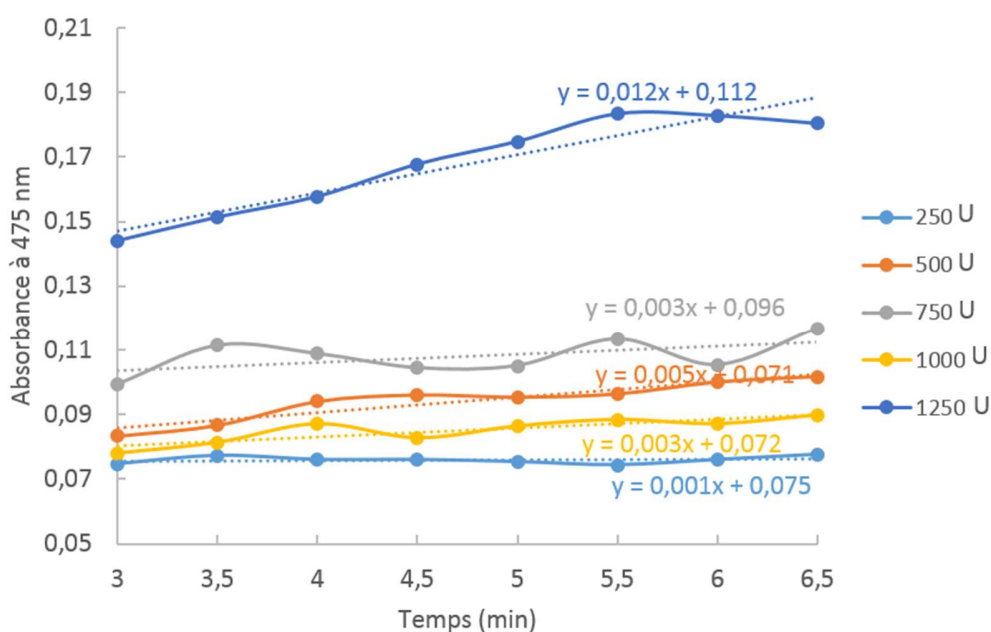


Figure 4-9 : Cinétiques de l'absorbance à 475 nm obtenues à différentes concentrations d'enzymes (250, 500, 750, 1000 et 1250 U.mL⁻¹) et une concentration de substrat de 1,0 mM, lors du test anti-tyrosinase (protocole n°3). Les courbes de tendance correspondant aux courbes à la tangente sont également représentées avec les équations respectives.

Différentes concentrations en substrat ont également été testées à 0,5, 1,0 et 1,5 mM avec une concentration d'enzyme de 1250 U.mL⁻¹ (Figure 4-10). Les mesures de DO en fonction du temps ont été différentes selon les concentrations en substrat et ont augmenté proportionnellement avec ces

concentrations. La concentration retenue permettant d'obtenir des DO plus élevées et donc une vitesse initiale plus précise, est 1,5 mM de L-tyrosine ($V_i = 0,040 \text{ min}^{-1}$).

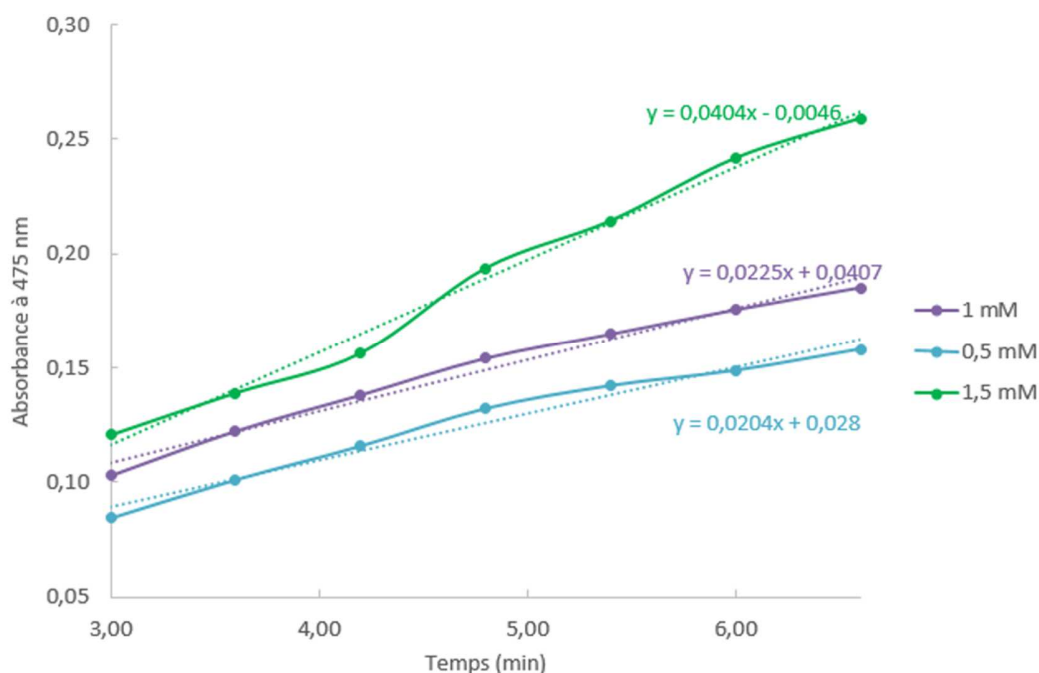


Figure 4-10 : Cinétiques de l'absorbance à 475 nm obtenues avec différentes concentrations de substrat (0,5, 1,0 et 1,5 mM) et une concentration d'enzyme de 1250 U.mL^{-1} lors du test anti-tyrosinase (protocole n°3). Les courbes de tendance correspondant aux courbes à la tangente sont également représentées avec les équations respectives.

2.3.2.2 Mise en place du protocole final

L'étude de [Zaidi et al. \(2014\)](#) a montré que le pH optimum de la tyrosinase est de 7,0 et la température optimale de 35°C , après de nombreux tests avec un pH entre 3 et 10, et une température entre 30 et 65°C . Notre étude a été menée à un pH 6,5 correspondant à la zone de pH optimum. Le fournisseur Sigma-Aldrich préconise également un pH optimum d'utilisation de l'enzyme entre 6,0 et 7,0 ([Sigma-Aldrich t3824 2018](#)). Concernant la température, des expériences à température ambiante et 25°C ont été menées dans notre étude, montrant des résultats avec des cinétiques avec moins d'artéfacts de mesure et des vitesses initiales plus élevées à 25°C . Le fournisseur Sigma-Aldrich conseille également cette température de 25°C ([Sigma-Aldrich t3824 2018](#)) ainsi que l'étude de [Kang et al. \(2004\)](#). Il serait tout de même intéressant de tester la réaction enzymatique au-delà de 25°C comme par exemple à 35°C comme le préconise [Zaidi et al. \(2014\)](#) ou 37°C ([Lim et al., 2009](#) ; [Jiménez et al., 2010](#)). La réaction peut être lancée en ajoutant au dernier moment soit le substrat, soit l'enzyme. [Kang et al. \(2004\)](#) et [Chan et al. \(2011\)](#) ont opté pour laisser incubé l'enzyme avec l'extrait et terminer par l'ajout de substrat afin de démarrer la réaction. Dans notre étude, nous avons testé les deux possibilités : ajout du substrat à la fin pour le protocole n°2 et ajout de l'enzyme à la fin pour les autres protocoles. Néanmoins, nous avons obtenu des

résultats avec de nombreuses oscillations sur la cinétique et ne donnant pas une courbe enzymatique souhaitée. Nous sommes ensuite revenus sur le protocole avec l'enzyme déposée à la fin comme dans l'étude de Jiménez et al. (2010). Nous avons également montré que la cinétique est plus adaptée pour le suivi d'une réaction enzymatique qu'une lecture de DO en point final, ainsi nous pouvons calculer les vitesses initiales des réactions et calculer le pourcentage d'inhibition de l'enzyme. De plus, nous pouvons voir directement par cinétique si la réaction enzymatique se déroule et si l'enzyme est active. De la même manière que pour le test anti-élastase, pour pouvoir déposer des volumes plus élevées d'enzyme pour permettre une meilleure précision du test, les volumes ont été augmentés lors du protocole n°5 en diminuant donc les concentrations initiales pour garder les mêmes concentrations finales de chaque produit. Ce protocole correspond donc au protocole final validé et représenté dans le [Tableau 4-5](#) ci-dessous. Quatre réactifs sont donc nécessaires pour ce test. Un litre de tampon phosphate a été préparé en dissolvant 4,117 g de Na_2HPO_4 et 8,639 g de NaH_2PO_4 dans de l'eau distillée. Le pH a été ajusté à 6,5. La L-tyrosine est ensuite préparée à 1,694 mM dans de l'eau distillée. Pour une bonne dilution, il faut chauffer légèrement sous agitation jusqu'à dissolution complète mais ne pas dépasser 60°C. Des aliquots des différents produits ont été effectués et conservés à -20°C. Ensuite, le réactif L-tyrosine a été préparé en mélangeant 2,5 mL de la L-tyrosine à 1,694 mM avec 2,25 mL d'eau distillé et 2,5 mL de tampon phosphate. C'est ce réactif L-tyrosine qui a été déposé dans les puits. L'enzyme, la tyrosinase, a été diluée dans du tampon phosphate à une concentration de 317 U.mL⁻¹. L'enzyme doit rester dans la glace jusqu'à utilisation. La vitesse initiale correspond au coefficient directeur de la tangente, calculée entre **192 et 384 s** (entre 3 et 6 min environ), en traçant l'absorbance en fonction du temps (absorbances obtenues toutes les 48 s). Enfin, le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant l'équation 2 (cf test anti-élastase, page 246).

Tableau 4-5: Protocole final du test anti-tyrosinase. Le réactif A correspond au tampon phosphate.

Produits	Concentration	Volume (µL)
Echantillon	x mg.mL ⁻¹	20
L-tyrosine = réactif B	1,694 mM	243
Incubation 5 min à 25°C		
Tyrosinase = réactif C	317,71 U/mL	42
Cinétique de 10 min à 475 nm		

2.3.2.3 *Activité anti-tyrosinase d'extraits d'algues brunes*

Tous les extraits testés d'algues brunes obtenus par macération ou ASE ont montré des activités anti-tyrosinase lors des tests avec le protocole optimisé (Figure 4-11). Cependant, nous avons observé des différences entre les algues et selon le type d'extraction. Comme pour l'activité anti-élastase, les extraits d'*H. siliquosa* ont présenté des activités moins intéressantes que les deux extraits de Fucaceae, *A. nodosum* et *F. serratus*. Cela peut s'expliquer par la présence de différents phlorotannins entre ces deux familles d'algues brunes : les Sargassaceae ayant des phlorotannins de petites tailles, et les Fucaceae ayant des phlorotannins de tailles plus importantes. En effet, l'extrait obtenu par macération d'*H. siliquosa* a inhibé la tyrosinase à 69,3% à 2 mg.mL⁻¹, alors que les extraits d'*A. nodosum* et de *F. serratus* ont inhibé la tyrosinase à des concentrations plus faibles avec 93,0% à 0,7 mg.mL⁻¹ et 100% dès 1 mg.mL⁻¹ respectivement (Figure 4-11A).

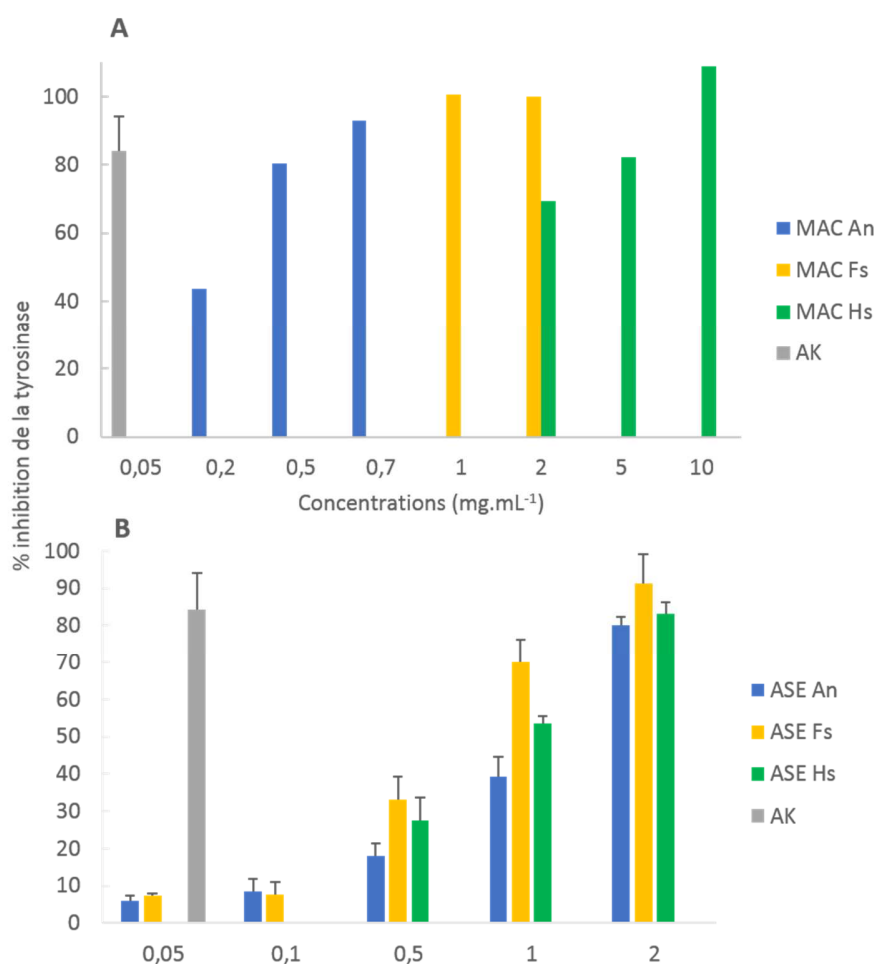


Figure 4-11 : Pourcentage d'inhibition de la tyrosinase par des extraits bruts d'*Ascophyllum nodosum* (An), *Fucus serratus* (Fs) et *Halidrys siliquosa* (Hs) obtenus par macération (A) ou par extraction accélérée par solvant ASE (B), à différentes concentrations (mg.mL⁻¹). Seules les fractions ASE An et Fs et l'acide kojique ont été réalisés avec n=3, les autres fractions à n=1.

Il serait intéressant de re-évaluer l'activité de *F. serratus* à des concentrations plus faibles pour pouvoir observer à partir de quelle concentration les 100% d'inhibition sont obtenus. Pour les extraits ASE, c'est l'extrait de *F. serratus* qui a présenté les plus forts pourcentages d'inhibition de la tyrosinase, comme pour l'élastase mais de manière moins importante. En effet, l'extrait ASE de *F. serratus* à 1 mg.mL⁻¹ a inhibé la tyrosinase à hauteur de 69,9% alors que les extraits d'*A. nodosum* et *H. siliquosa* à la même concentration ont inhibé l'enzyme à 39,4% et 53,6% respectivement. Comparativement au type d'extraction, la macération permet d'obtenir des extraits plus actifs contre la tyrosinase pour les deux Fucaceae alors que c'est l'ASE qui permet d'obtenir une inhibition plus importante de la tyrosinase pour la Sargassaceae, *H. siliquosa*. Comme ce sont des extraits bruts, d'autres molécules extraites avec les phlorotannins sont peut-être responsables de cette activité lorsqu'il y a extraction avec l'ASE.

Cependant, ces extraits ne sont pas aussi actifs que le témoin positif (acide kojique) qui permet d'inhiber la tyrosinase à 84,2% à une concentration de 0,05 mg.mL⁻¹. Il serait intéressant d'observer si des fractions purifiées enrichies en composés phénoliques permettent d'obtenir des activités anti-tyrosinase plus élevées que les extraits bruts.

2.4 Conclusion

Le secteur des cosmétiques anti-âge est actuellement bien établi et en plein essor. De nombreuses molécules sont considérées comme des ingrédients prometteurs pour ralentir les différents symptômes de l'âge. C'est le cas notamment des molécules anti-élastase qui évitent la dégradation des fibres élastiques de la matrice extracellulaire, principalement constituées par l'élastine. L'activité anti-tyrosinase est aussi une activité recherchée pour permettre d'éviter l'apparition de taches pigmentaires sur la peau. Dans cette étude, certains extraits bruts des 3 algues brunes ont présenté des activités anti-élastase aussi intéressantes que le témoin positif, l'EGCG. Concernant l'activité anti-tyrosinase, les extraits n'ont pas permis d'inhiber de manière aussi importante que le témoin positif, l'acide kojique. D'autre part, l'inhibition la plus forte a été retrouvée chez les deux Fucaceae pour les deux tests enzymatiques comparativement à la Sargassaceae. Par ailleurs, des fractions purifiées de ces deux Fucaceae ont montré des activités plus élevées que les extraits bruts suggérant que l'activité est principalement due aux phlorotannins. Il serait intéressant d'évaluer ces activités sur les fractions purifiées enrichies en composés phénoliques pour l'activité anti-tyrosinase. Nous avons utilisé une méthode spectrophotométrique pour déterminer ces deux activités. En effet, c'est la technique la plus utilisée mais qui présente cependant des limites comme le manque d'automatisation et une consommation de temps et d'échantillons, fastidieux pour réaliser un screening (Tang et al., 2015). Des méthodes, autres que des techniques spectrophotométriques existent, notamment pour l'activité anti-tyrosinase, comme des méthodes

chromatographiques, électrophorétiques, radiométriques ou encore électrochimiques (Zolghadri et al., 2019). Zhou et al. (2016) ont par exemple développé une méthode par Chromatographie sur Couche Mince qui nécessite peu de pré-traitement d'échantillon, un équipement peu coûteux, une quantité faible d'échantillon et d'enzyme. Ils ont détecté l'activité par la présence de spot blanc au jaune pâle sur fond noir et quantifié l'activité de la tyrosinase par un scan de la densité des spots, exprimé en capacité d'inhibition de la tyrosinase relative. Dans cette étude, ils ont également mené une méthode spectrophotométrique (comme dans notre étude) et une méthode utilisant des tests cellulaires. Pour la méthode cellulaire, ils ont utilisé des cellules de mélanome malin B16 incubées avec les extraits à tester : de la L-DOPA a ensuite été incubé à 37°C pendant 60 min et la teneur en mélanine a été déterminée à 475 nm. En comparant les 3 méthodes, ils ont retrouvé des résultats similaires d'activité anti-tyrosinase et ont montré une corrélation positive entre les méthodes. Comme ces 3 méthodes apparaissent similaires, le choix de la méthode conviendra donc au matériel à disposition de chacun, le coût total du test et aussi la quantité d'échantillons utilisée.

3 Stabilité des composés phénoliques

La stabilité des composés phénoliques a été suivie directement dans les extraits secs dans un premier temps, puis dans une crème cosmétique dans différentes conditions. La partie du suivi dans la crème fait l'objet d'un manuscrit rédigé en anglais.

3.1 Stabilité des composés phénoliques dans un extrait sec

La stabilité des composés phénoliques d'un extrait d'*Halidrys siliquosa* obtenu par macération ou par extraction accélérée par solvant a été menée.

3.1.1 Matériel et méthodes

Deux types d'extraction ont été effectués sur *H. siliquosa* récoltée en janvier 2017 : une macération classique (cf Chapitre 2, page 101) et une extraction accélérée par solvant (ASE, cf Chapitre 2, page 103) obtenue avec un cycle et 150°C à la plateforme BIODIMAR. Les extraits obtenus ont été lyophilisés et conservés soit à l'obscurité à -20°C, 4°C, température ambiante (TA) ou 50°C, soit à la lumière à TA. Les techniques d'analyses ont été les mêmes que pour le manuscrit en préparation ci-dessous, avec l'analyse des composés phénoliques par ¹H RMN et par le test du Folin-Ciocalteu ainsi que l'activité anti-radicalaire par le test du DPPH. Ces analyses ont été effectuées dès l'obtention de l'extrait lyophilisé (D0) et ensuite 30 et 90 jours plus tard (D30 et D90). Le logiciel R pour Windows a été utilisé, avec l'environnement de développement intégré RStudio (v 1.2.1335). Les résultats sont donnés en termes de moyenne ± écart-type. L'homogénéité des variances a été testée avec le test de Bartlett avec un risque d'erreur de 5%. L'homogénéité des variances étant respectée ($p > 0,05$), l'ANOVA à un facteur a été utilisée. Quand des différences significatives apparaissaient, des comparaisons ont été effectuées grâce au test post-hoc Tukey.

3.1.2 Résultats et discussions

3.1.2.1 Suivi des composés phénoliques par RMN ¹H

Le profil des composés phénoliques par RMN ¹H a été suivi lors de la conservation de deux extraits différents d'*Halidrys siliquosa* : par macération (MAC) et par extraction accélérée par solvant (ASE) (Figure 4-12). Pour l'extrait MAC, les plus grands pics ont été observés entre 6,5 et 6,3 ppm avec 3 pics. Nous avons noté qu'à 50°C l'observation des pics est plus difficile, notamment au bout de 90 jours (D90), ce qui est différent pour les autres conditions, suggérant une diminution des composés phénoliques à cette température de 50°C.

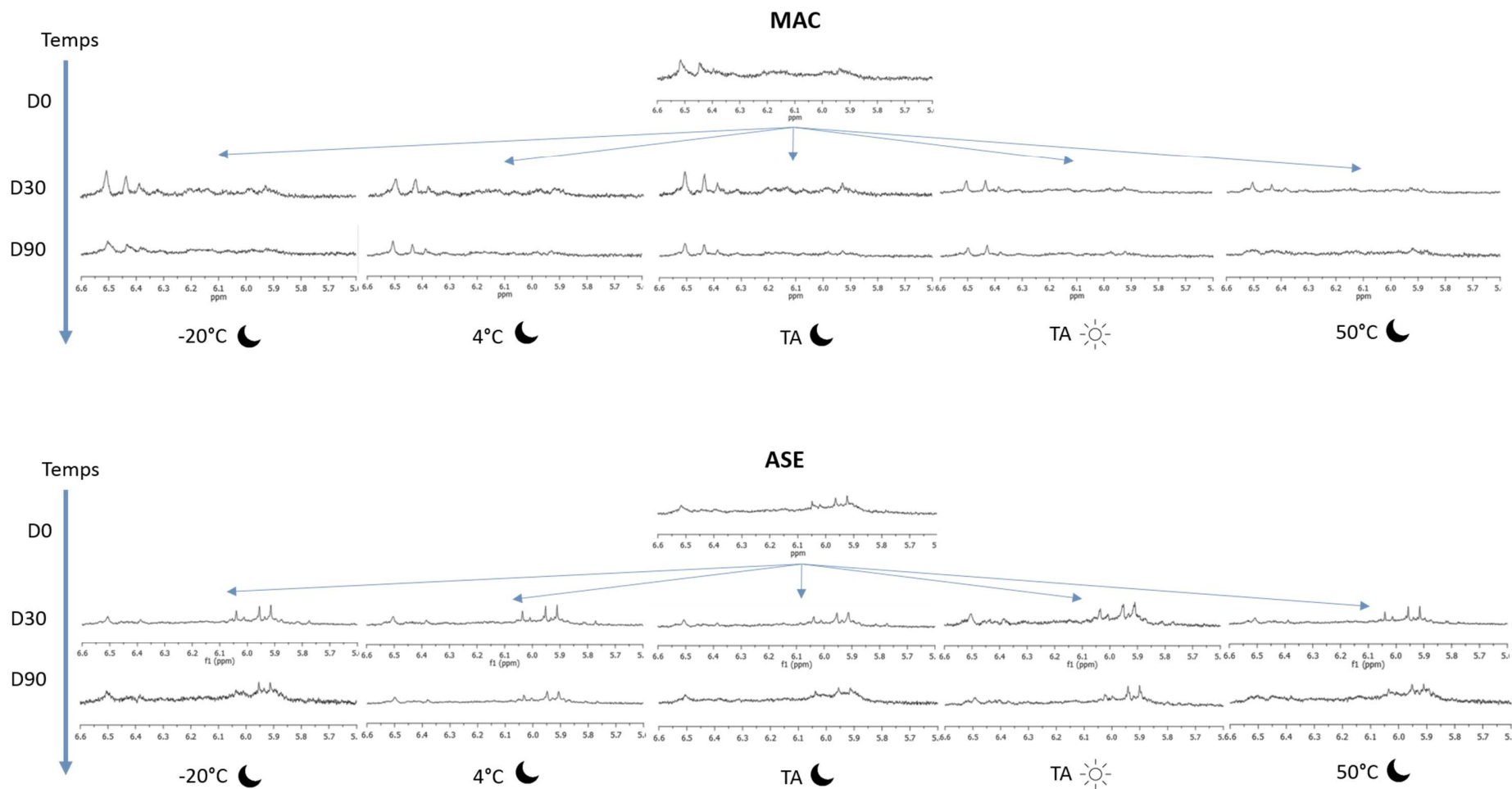


Figure 4-12 : Spectres RMN ^1H , focalisés sur la zone des composés phénoliques entre 6,6 et 5,6 ppm, des extraits d'*Halidrys siliquosa* obtenus par macération (MAC) ou extraction accélérée par solvant (ASE) stockés dans différents conditions de température (-20°C, 4°C, température ambiante TA ou 50°C) et de luminosité (lumière ou obscurité représenté par le soleil et la lune respectivement). Ces spectres ont été obtenus à différents temps de stockage : le jour de l'obtention de l'extrait (D0) et après 30 et 90 jours de stockage (D30 et D90 respectivement).

Le profil de l'extrait ASE est différent de l'extrait MAC avec des pics plus abondants entre 6,1 et 5,8 ppm. Au bout de 30 et 90 jours, quelque soit la condition de stockage, nous obtenons toujours le même profil de pics dans la zone des composés aromatiques.

3.1.2.2 Teneur en composés phénoliques

Aucune différence significative de la teneur en CP n'a été observée entre le début de l'expérience (D0) et au bout de 30 et 90 jours de stockage pour les deux extraits MAC et ASE stockés à l'obscurité à température ambiante (TA) (ANOVA, $p = 0,077$ et $p = 0,825$ respectivement) (Figure 4-13). A l'inverse, la lumière semble avoir un impact mais seulement pour l'extrait MAC et non l'extrait ASE. En effet, la teneur en CP a diminué significativement à la lumière à température ambiante pour l'extrait MAC comparativement au début du stockage avec une teneur de $96,8 \text{ mg.g}^{-1}$ d'extrait sec à D0, $89,7 \text{ mg.g}^{-1}$ d'extrait sec à D30 et $92,4 \text{ mg.g}^{-1}$ d'extrait sec à D90 (Tukey, $p < 0,001$ entre D0 et D30, $p = 0,001$ entre D0 et D90). Cependant, la teneur en CP paraît se stabiliser puisqu'il n'y a pas de différence significative entre les 30 et les 90 jours de stockage (Tukey, $p = 0,763$). A 4°C à l'obscurité, les teneurs en CP ont été maintenues dans le temps pour les deux extraits MAC et ASE (ANOVA, $p = 0,112$ et $p = 0,495$).

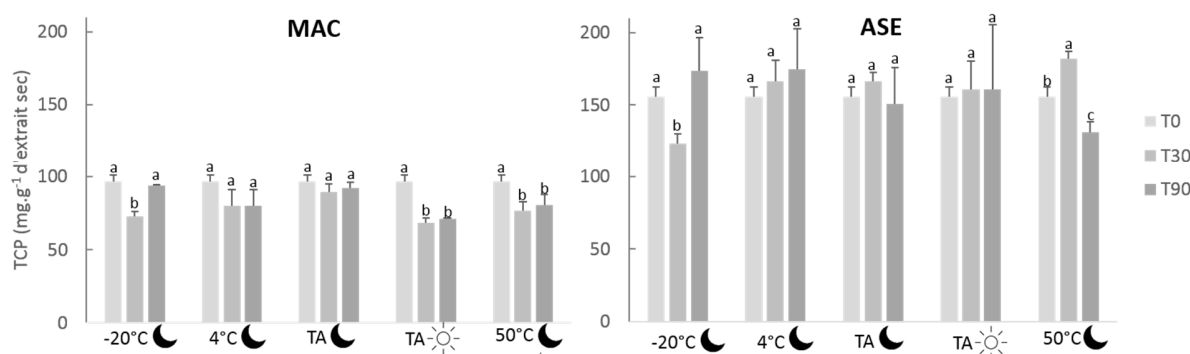


Figure 4-13 : Teneurs en composés phénoliques des extraits obtenus par macération (MAC) et par extraction accélérée par solvant (ASE) d'*Halidrys siliquosa* déterminées lors de l'obtention de l'extrait (D0) et 30 et 90 jours de stockage dans différentes conditions de température (-20°C , 4°C ; température ambiante TA ou 50°C) et de luminosité (lumière ou obscurité représenté par le soleil et la lune respectivement). Les lettres indiquent une différence significative entre les extraits au cours du temps pour chaque condition indépendamment (ANOVA à un facteur, $p < 0,04$).

Pour le stockage à -20°C , nous avons mis en évidence une diminution significative au bout de 30 jours de stockage pour l'extrait MAC (Tukey, $p < 0,001$). Cependant au bout de 90 jours, la teneur en CP n'est pas significativement différente comparativement au D0 (Tukey, $p = 0,494$), suggérant un problème de dosage à D30. Pour cela, il faudra vérifier cette diminution, en effectuant un nouveau dosage pour observer s'il y a vraiment une diminution importante de la teneur en CP. Pour l'extrait ASE stocké à -20°C , la teneur en

CP a été significativement différente entre D0 et D30, ainsi qu'entre D0 et D90 (Tukey, $p = 0,363$) mais pas entre D0 et D90, montrant davantage un problème dans le dosage. La conservation à -20°C paraît maintenir la teneur en CP dans le temps. A l'inverse, le stockage à 50°C a entraîné une diminution des CP au cours du temps. En effet, la teneur de l'extrait MAC était de $96,8 \text{ mg.g}^{-1}$ d'extrait sec à D0 alors qu'elle était de $76,9 \text{ mg.g}^{-1}$ d'extrait sec à D30 et $80,9 \text{ mg.g}^{-1}$ d'extrait sec D90. Comme lors du stockage à la lumière, la teneur s'est stabilisée après 30 jours puisqu'il n'y a pas de différence significative de la teneur en CP entre 30 et 90 jours de stockage (Tukey, $p = 0,703$). Concernant l'extrait ASE, c'est au bout de 90 jours qu'une diminution de la teneur en CP a été observée avec une teneur de $155,8 \text{ mg.g}^{-1}$ d'extrait sec à D0 et de $131,0 \text{ mg.g}^{-1}$ d'extrait sec à D90 (Tukey, $p = 0,001$). Ainsi, dans certaines conditions, des diminutions de la teneur en CP ont été observés mais ne sont pas drastiquement importantes, d'où le fait de ne pas l'apercevoir avec la RMN. Cependant, la plus forte chute des CP observée a été à 50°C , ce qui a pu être observé en RMN pour l'extrait MAC. Cette chute de la teneur en CP a déjà été observée par [Cuong et al. \(2016\)](#) sur des extraits éthanoliques de six espèces de Sargasses : ils ont observé une diminution des CP entre 23 et 63%, selon les espèces, au bout de 365 jours de stockage.

3.1.2.3 Activités anti-radicalaires

Les résultats ont montré que l'activité anti-radicalaire a été impactée par le stockage quelque soit les conditions, à partir de 30 jours pour l'extrait MAC et à partir de 90 jours pour l'extrait ASE ([Figure 4-14](#)).

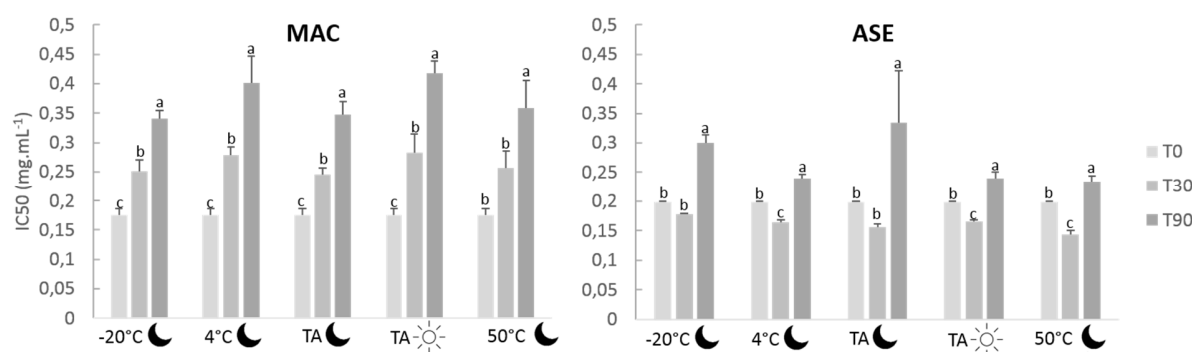


Figure 4-14 : Activités anti-radicalaires des extraits obtenus par macération (MAC) et par extraction accélérée par solvant (ASE) d'*Halidrys siliquosa* déterminées lors de l'obtention de l'extrait (D0) et 30 et 90 jours de stockage dans différentes conditions de température (-20°C , 4°C ; température ambiante TA ou 50°C) et de luminosité (lumière ou obscurité représenté par le soleil et la Lune respectivement). Les lettres indiquent une différence significative entre les extraits au cours du temps pour chaque condition indépendamment (ANOVA à un facteur, $p < 0,03$).

En effet, l'IC50 de l'extrait MAC a augmenté significativement pour toutes les conditions de stockage entre D0 avec une concentration de $0,175 \text{ mg.mL}^{-1}$ et D30 avec des concentrations comprises entre $0,245$ et $0,283 \text{ mg.mL}^{-1}$ (selon les conditions) mais aussi entre D30 et D90 avec des concentrations comprises entre $0,341$ et $0,417 \text{ mg.mL}^{-1}$ à D90. L'extrait ASE a montré une diminution à 90 jours et non à 30 jours avec une

IC50 de 0,199 mg.mL⁻¹ à D0 et comprises entre 0,234 et 0,335 mg.mL⁻¹ à D90 selon les conditions. Cette perte d'activité a déjà été démontrée, notamment par [Cuong et al. \(2016\)](#) sur des extraits éthanoliques de six espèces de Sargasses : au bout de 365 jours, l'activité anti-radicalaire a chuté entre 24 et 61% selon les espèces.

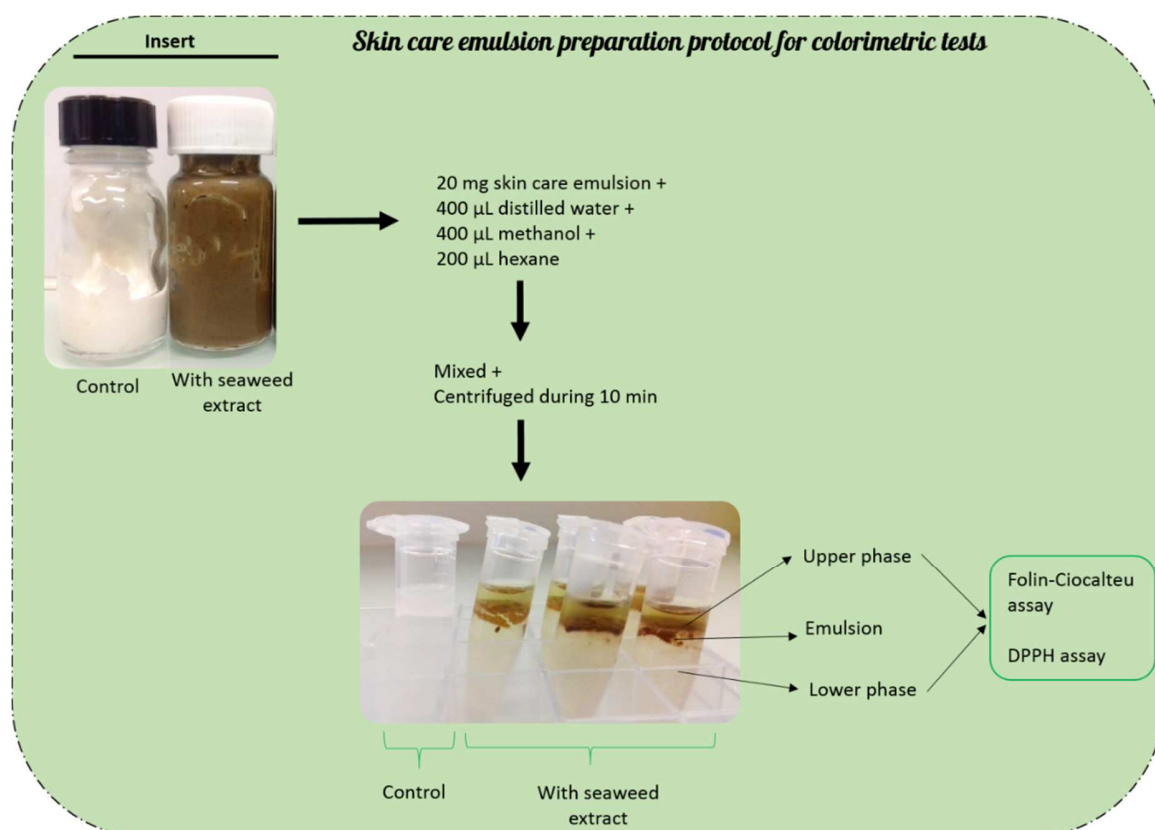
3.1.3 Conclusion

Une diminution de la teneur en CP dans l'extrait sec d'algue a pu être observée selon certaines conditions de stockage mais cette diminution est tout de même assez faible et à suivre plus longtemps encore dans le temps. Le stockage à température ambiante à l'obscurité a permis de maintenir la teneur en CP constante pendant 90 jours pour les deux extraits. Il sera intéressant de poursuivre au-delà de 90 jours. Cependant, le stockage à température ambiante semble être possible seulement à l'obscurité et non à la lumière, notamment pour l'extrait obtenu par macération. Par ailleurs, l'activité anti-radicalaire a tout de même été perdue lors du stockage à l'obscurité. Le stockage à 4°C ainsi qu'à -20°C, à l'obscurité, a permis de maintenir les teneurs en CP des deux extraits au bout de 90 jours de stockage. Cependant, une faible diminution de l'activité anti-radicalaire a tout de même été révélée. Le stockage au froid et à l'obscurité apparaît être le meilleur compromis pour préserver l'intégrité des CP ainsi que leur activité anti-radicalaire. Cette conservation est largement possible en cosmétique en adaptant le packaging du produit cosmétique de manière à le rendre opaque. D'autre part, une recommandation de conservation au froid peut-être mise en place. Cette partie a montré la stabilité des CP dans les extraits secs, mais qu'en est-il lorsqu'ils sont inclus dans une formulation cosmétique ?

3.2 Stabilité des composés phénoliques dans une crème cosmétique

Les composés phénoliques représentent un fort potentiel de valorisation dans l'industrie cosmétique pour remplacer les produits synthétiques, en raison de leurs nombreuses propriétés comme antioxydant, antimicrobien ou anti-âge. Après une extraction accélérée par solvant (ASE), un extrait d'*H. siliquosa* a été incorporé dans une crème cosmétique. Une étape importante à considérer pour une valorisation industrielle est la stabilité de ces molécules au sein de la galénique. Cette étude vise donc à suivre la présence et la concentration des composés phénoliques d'une algue brune dans une émulsion pour le soin de la peau. La présence de ces composés a été identifiée dans la formulation, grâce à une analyse en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton (chaque composant de la crème a été analysé d'abord un à un). Dans le but de valider cette méthode qualitative, la teneur en composés phénoliques et l'activité antiradicalaire ont été dosées dans la formulation, en utilisant un dosage modifié du Folin-Ciocalteu et le test du DPPH adapté (cf Encart « Skin care emulsion preparation protocol for colorimetric tests »). Le suivi des composés phénoliques a été mené avec la crème contenant l'extrait et en contrôle la crème sans l'extrait, conservées pendant 180 jours dans plusieurs conditions de lumière (présence/absence) et de température (4°C, température ambiante et 50°C pour simuler un vieillissement de la crème) avec différentes mesures au cours du temps. Un suivi plus général a également été effectué en évaluant la couleur de la crème, les variations d'odeur et la mesure du pH. Étonnamment, une forte diminution des composés phénoliques a été mise en évidence après 30 jours de stockage quelque soit la condition. Cette diminution a été visible sur les spectres RMN et validée par le test colorimétrique. D'autre part, cette baisse des composés a été plus importante à 50°C puis à température ambiante et enfin à 4°C, démontrant l'impact de la température sur la stabilité des composés, quelque soit les conditions de lumière. C'est la première fois que des phlorotannins inclus dans une émulsion sont observés qualitativement et quantitativement. Nous avons discuté des résultats obtenus notamment concernant l'obtention des empreintes RMN, méthode analytique qui ouvre de nouvelles voies rapides de traçabilité des ingrédients dans les produits cosmétiques.

Les résultats de l'étude de la stabilité des composés phénoliques dans une crème sont rassemblés dans le manuscrit rédigé en anglais ci-dessous. Il a été soumis le 7 juin 2019 dans la revue Talanta mais a été refusé pour ne pas avoir répondu aux objectifs du journal, axés sur les avancées en matière de méthodologie analytique. L'objectif est de scinder ce manuscrit en deux : un premier axé sur la méthodologie menée pour détecter les composés phénoliques dans une crème cosmétique à resoumettre dans Talanta et un deuxième sur le suivi dans le temps des composés phénoliques dans la crème à soumettre dans un journal axé cosmétologie.



The use of NMR to monitor the presence and the stability of active phlorotannins within a cosmetic emulsion

Leslie Gager^a, Stéphane Cérantola^b, Solène Connan^a, Marilyne Fauchon^a, Claire Hellio^a, Valérie Stiger-Pouvreau^a

^a Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, F-29280 Plouzane, France

^b Service commun de Résonance Magnétique Nucléaire, UFR Sciences, Université de Bretagne Occidentale, 6 avenue Victor Le Gorgeu – CS93837, 29238 Brest Cedex 3, France

Abstract

Phenolic compounds represent a strong potential for valorization in the cosmetic industry to replace synthetic products, due notably to their antioxidant and antimicrobial potential. After their extraction from algal biomass, they are incorporated into a cosmetic galenic. However, an important step to consider is to follow the active molecules and their stability within the galenic. This study aims thus to monitor the presence and level of specific algal phenolic compounds within a skin care emulsion. The presence of phlorotannins, extracted and purified from a brown seaweed through Accelerated Solvent Extraction, was interestingly identified within the galenic, thanks to Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR). In the aim to validate this qualitative method, the total phenolic content (TPC) and associated radical-scavenging activity, were assayed on the galenic, using adapted Folin-Ciocalteu and DPPH colorimetric tests. The presence and the stability of active ingredients were tested on samples of a cosmetic cream containing or not the active extract, and stored for 180 days in several conditions of light (absence/presence) and temperature (4°C, room temperature and 50°C to simulate an ageing of the cream) with measurements at specific intervals. Finally, a general view of the emulsion was evaluated through cream color, odor variations and pH measurement. Surprisingly after 30-day storage of the emulsion, a huge decrease in TPC was highlighted whatever the storage condition, which

was visible on NMR spectra and validated by colorimetric tests. This decrease over time is higher at 50°C followed by room temperature and finally 4°C, demonstrating the impact of temperature on the stability of TPC, whatever the light condition. Interestingly, we were able to follow the presence of phlorotannins within a cosmetic cream using ¹H NMR fingerprints. This is the first time that phlorotannins included in an emulsion are qualitatively and quantitatively observed. Our results are discussed in regard to the power of obtaining ¹H NMR fingerprints of the cosmetic cream all along the monitoring period, which open new and rapid way of traceability of active ingredients within cosmetic products.

Keywords

Cosmetic, ¹H NMR, polyphenols, seaweed, stability

Introduction

In cosmetic industries, the use of biomolecules from marine organisms is increasing and macroalgae are promised [1-6]. Berthon et al. [7] showed the action of different algal compounds on the physiological processes to preserve skin health. The algal compounds of interest include polysaccharides, mycosporine-like amino acids (MAAs), pigments and polyphenols. Seaweed extracts can be active ingredients for slimming, moisturizing and antiaging products and also a source of excipients or additives [7, 8].

Brown seaweeds are an interesting biomass thanks to the presence of high level of specific phenolic compounds called phlorotannins. These

metabolites are formed through the polymerization of phloroglucinol units (1,3,5-trihydroxybenzene). Phlorotannins have a role in the algal protection against stresses induced by numerous biotic and abiotic factors like grazing by herbivorous, UV radiation or epiphytism [9-11]. These molecules showed then a diversity of bioactivities like sunscreen, antioxidant and bactericide capacities or also enzymatic inhibitory effect like matrix metalloproteinases, hyaluronidase, elastase, and tyrosinase inhibition [12-14, reviewed by Gager et al. (in press)]. Thanks to this panel of properties, phlorotannins have a commercial interest in cosmetic industry.

To be valorized, the stability of active molecules within the final product is paramount. According to the seaweed drying process after harvesting, these metabolites can be more or less degraded [15, 16]. Also, the stability of an algal extract is an important issue in the development of the product: the storage time of an extract has an effect on the total phenolic content and antioxidant activities of crude extract or purified fraction from brown seaweed [17-20]. But one of the most important point is the stability of active molecules over time when they are included in the cosmetic emulsion. Padilla et al. [21] developed a method to determine phenolics in cosmetic creams through the de-emulsification of the emulsion. This method was set up using phenolic acid standards (found in higher plants) incorporated in a cosmetic cream and then further measured using their assay. However, to our knowledge, no study has yet shown a quantification of algal phenolic compounds included into a cosmetic cream and a stability monitoring through their visualization by NMR over time. Some studies have observed the stability of the emulsion containing a brown seaweed fraction but only through the evaluation of the state of the emulsion like the droplet size and morphology or rheological parameters [22-25].

The present study focused then on the stability of phlorotannins from a brown seaweed extract, included in a skin care emulsion over a 180-day storage under various temperature conditions, 4°C, room temperature (18-20°C) and up to 50°C, and through the exposition of the cream or not to the light. Three analyses were carried out: first, qualitative variables were appreciated on the emulsion, i.e. the cream color, odor and pH variations were evaluated; then, an assessment of the presence and composition in phlorotannins was performed using ¹H Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR). Finally, two quantitative variables, i.e. levels of phenolic compounds and associated antioxidant activity, were determined by adapted Folin-Ciocalteu and DPPH assays respectively, in the aim to validate phenolic signals monitored using NMR.

Material and methods

Collection of seaweed and preparation of the extract

The brown seaweed *Halidrys siliquosa* (Linnaeus) Lyngbye (Fucales, Phaeophyceae) was collected in the west part of Brittany by the SME C-WEED AQUACULTURE in January 2016. The macroalgal biomass was dried and then ground to powder using a ball mill (Retsch MM400, Germany).

Phlorotannins were extracted using an Accelerated Solvent Extraction system (Dionex™ ASE™, USA) using a mixture of ethanol and water (75/25 v/v). Extraction parameters were as follow: one cycle at 150°C under 100 bar pressure as this condition was proved to give an interesting phlorotannins yield (unpublished data). After extraction, the solvent was evaporated using a rotary evaporator (Laborota 4000 efficient, Heidolph, Germany) and the extract was freeze-dried (Beta 1-8 LD, Christ, Germany).

Preparation of the skin care emulsion

A skin care emulsion was prepared using different ingredients from Aroma-Zone (site of online sales for cosmetic ingredients) products (Table 1). All

ingredients of the cream, except the preservative and the active extract, were introduced in a stainless-steel bowl and heated in a water bath until 80°C. During the heat, all ingredients were mixed slowly thanks to whip. When the temperature reached 80°C, the bowl was removed from the bath and the mixture was mixed vigorously during 3 min. Then, the bowl was settled on ice and the mixture was again mixed until the cooling was complete. To finish, the preservative and the brown seaweed extract, representing 5% of the final cream, were added. The reference/control of the skin care emulsion was the cream without seaweed extract.

Table 1: Ingredients used to formulate the skin care emulsion. Quantities of ingredients used to constitute the cosmetic cream are based on protocols published on the Aroma-Zone website (<https://www.aroma-zone.com>).

Source	Ingredients	Quantity
Aroma-Zone	Demineralized water	31 g
Aroma-Zone	Emulsifier cream heart	15 g
Aroma-Zone	Organic <i>Aloe vera</i> oil macerate	10 g
Aroma-Zone	Geranium hydrolate	36 g
Aroma-Zone	Cosgard preservative	20 drops
<i>H. siliquosa</i>	Active phlorotannins extract	5 g

Color, odor and pH evaluations on the skin care emulsion

When the use of new ingredients is evaluated in a galenic, especially natural ingredient, the physical appearance of the cream together with the odor of the product are important for the consumer and their acceptance. Color was evaluated thanks to a Pantone Color Guide for Fashion Home + Interiors (FHI). The odor was also followed by a panel of ten people. The pH of the cream was measured the day of formulation (D0) and after 180 days of storage

(D180) (pH Meter Mettler Toledo MP220). Those three parameters are conventionally evaluated in cosmetics [26].

Detection of phlorotannins by ¹H NMR within the skin care emulsion

¹H NMR spectra were acquired on Bruker Avance III HD500 spectrometers equipped with a BBO probe or a TCI cryoprobe. Each spectrum was obtained with at least 96 scans. ¹H NMR spectra for each ingredients of the emulsion was shown in supplementary data (Fig. S1). Few milligrams of the skin care emulsion were dissolved in deuterated methanol (MeOD). Spectra were obtained for the skin care emulsion without or with *H. siliquosa* extract at 1 or 5%. They were analyzed with the MestReNova software (v6.0.2-5475).

Monitoring of the stability of phlorotannins within the skin care emulsion

The skin care emulsion was dispatched into different samples to be exposed to different storage conditions (light and temperature) for 180 days: at 4°C in the dark, at room temperature (18-20°C) in the light and in the dark and at 50°C in the dark. This last temperature allows an accelerated ageing process to be carried out in order to evaluate the stability of the product. It is conventionally used in cosmetics to determine the deadline for the optimal use and the post-opening period [26].

- Presence and composition of phlorotannins by ¹H NMR analyses

At D0 (day of the preparation of the skin care emulsion), D15, D30, D90 and D180 (15, 30, 90 and 180 days of storage respectively), ¹H NMR analyses were carried out to observe the different signals corresponding to phlorotannins within the skin care emulsion and their stability in relation with the storage time.

- Quantification of phlorotannins by the Folin-Ciocalteu assay

In order to check the evolution of the total phenolic content (TPC) within the skin care emulsion, in parallel of the ^1H NMR analysis, we also assayed the TPC using a colorimetric test. A direct determination of the phenolics in the cream was not possible because the emulsion cannot be completely well dissolved. So, the phenolic compounds were first extracted from the galenic using an extraction method inspired by [21]: 20 mg of skin care emulsion were mixed with 400 μL of distilled water, 400 μL of methanol and 200 μL of hexane. The preparation was well mixed and centrifuged. Two phases were obtained, the phenolic compounds were assayed in the lower phase in which they were detected.

The TPC was colorimetrically determined by spectrophotometry using an adapted Folin-Ciocalteu assay [27, 28]. First, 20 μL of the lower phase were filled in the wells, followed by 130 μL of distilled water, 10 μL of Folin-Ciocalteu reagent and 40 μL of Na_2CO_3 (200 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). After 10 min at 70°C , the microplate was cooled on ice to stop the reaction. Absorbance was read at 620 nm (Multiskan™ FC, Thermo Scientific™, USA). This analysis was carried out in triplicate on the skin care emulsion sampled directly after the formulation (D0) and after 30 (D30), 90 (D90) and 180 days (D180) of storage. The TPC was expressed in milligram equivalent phloroglucinol per gram of emulsion ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) using a standard curve of phloroglucinol.

- Associated radical-scavenging activity of phlorotannins using the DPPH test

First, the extraction of phlorotannins from the skin care emulsion was the same as for the Folin-Ciocalteu assay. A 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay modified according to [27] was used to determine the radical scavenging activity of the skin care emulsion: 22 μL of the lower phase was added to 200 μL of DPPH

solution (25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) prepared fresh daily. The absorbance was read at 540 nm after one hour in the dark at room temperature. Ascorbic acid (vitamin C), α -tocopherol (vitamin E), 2,3-t-butyl-4-hydroxyanisole (butylated hydroxyl-anisole, BHA) and 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (butylated hydroxytoluene, BHT) were used as positive controls and distilled water as negative control. This analysis was carried out in triplicate on skin care emulsion sampled directly after the formulation and after 120 and 180 days of storage (D0, D120 and D180, respectively). The radical scavenging activity of the skin care emulsions was expressed as percentage of inhibition taking into account the activity of the emulsion control.

Statistical treatment of data

The software R for Windows was used with the RStudio (v. 1.0. 136) integrated development environment. The Bartlett test was implemented to test the homogeneity of variances at the 5% risk error. As homogeneity of variances was validated, one-way ANOVA analyses were performed. Tukey post-hoc test was applied to determine the difference.

Results and discussion

Variations of color, odor and pH

When adding 5% of the seaweed extract, the color of the skin care emulsion was directly modified from white to brown (Table 2). Poyato et al. [24] also evaluated a color difference between the reference emulsion and the one containing a brown seaweed extract from *Fucus vesiculosus*, used at 0.1 or 0.2% with higher yellowness detected with the extract thanks to a digital colorimeter. Balboa et al. [23] observed a color variation of an emulsion from white to beige with a *Fucus* sp. extract or to dark brown with a *Sargassum muticum* extract at 0.15%. The brown color was also noted by [29] when they added a *Fucus vesiculosus* extract at 0.05 or 0.1% due to the presence of brown-colored xanthophylls.

Nevertheless, Choi et al. [22] showed no change in appearance, color or odor in an emulsion containing 0.5% of a purified fraction from the brown seaweed *Ecklonia cava* according to sensory evaluation. The difference in this last example, compared with other publications and our results, was the purification of the extract, removing numerous pigments and involving thus less brown molecules, like carotenoids or carbohydrates as examples. The change in color could also come from the nature of phlorotannins in *Ecklonia cava* and Fucales, the first producing eckols while fucols, phloroethols, fucophlorethols and fuhalols are produced by the second [13, 14].

About the odor, a modification was observed when we included the seaweed extract: appearance of caramelized, smoky or toasted bread odors which was appreciated by half of the people surveyed. Choi et al. [22] observed no change in odor but they used a purified fraction from *Ecklonia cava* containing less odorous molecules than a crude extract. The smell of seaweed and seawater was only found by two out of ten people. If the odor is not well accepted, the use of ingredients in the formulation to change the odor can be implemented: it is the case for Balboa et al. [23] where the sensory analysis showed that people preferred the cream with the seaweed with a specific thermal water. Moreover, the choice of the thermal water differed with the extract of algae used. In terms of odor, they highlighted more acceptance for preparations containing *S. muticum* extract followed by *Fucus* sp. extract and tocopherol.

Concerning the pH measurement, a variation of pH was observed between the skin care emulsion control and the emulsion containing the brown seaweed extract with a decrease from 5.5 to 4.6. Balboa et al. [23] showed also a slightly lower pH in the emulsion containing *Sargassum muticum* extract at 0.15% with a decrease from 6.5 to 5.5. Nevertheless, Choi et al. [22] showed no change in

the pH of an emulsion containing 0.5% of *Ecklonia cava* purified fraction (and not a crude extract as in this work) according to sensory evaluation. In our study, the pH values were in adequacy with the natural skin surface pH which is on average 4.7, then below 5 [30].

In our study, after only 30-day storage, variations were noticed in the color of the skin care emulsion containing the seaweed extract according to the different temperatures (Table 2). We noticed that the emulsion at 4°C was the clearest and moreover, the darkest sample was obtained at 50°C after 30, 90 and 180 days of storage. The fractions at room temperature had the same color whether being in the dark or in the light all along the 180 days. The light apparently did not affect the color of the sample whereas the storage temperature was an important parameter to take into account. Thanks to a digital colorimeter, Poyato et al. [24] observed noticeable color changes of a skin care emulsion containing 0.1 or 0.2% of a *Fucus vesiculosus* extract which became browner in color over time during the 56 days of storage. They found also that the temperature produced color changes especially at 40°C. Nevertheless, unlike our study, they found that the light condition at room temperature had also a color effect. For the latter two conditions, the samples became browner over time. After 270 days of storage in the dark at room temperature, experiments from Balboa et al. [23] showed that suncreams formulated with a *Sargassum muticum* extract bring on an increase in lightness determined thanks to a CIELab Color Space which expressed color as three numerical values, lightness, green-red and blue-yellow color components. One recommendation could then be to package the commercial product within a dark container in the aim to preserve active compounds.

About the odor, variations were observed after 180 days of storage. Spicy smells were found for the emulsion kept at 4°C while the sample kept at 50°C

was more appreciated with a roasted smell and vegetable oil such as jojoba oil.

Concerning the pH, whether for the control emulsion or the emulsion with the seaweed extract, the pH decreased regardless of the storage conditions (Table 2). No difference was observed between the room temperature and 4°C for the emulsion control but for the emulsion with seaweed extract, the pH was higher at 4°C than at room temperature. At 50°C, the pH was the lowest with 4 and 3.5 for the emulsion control and the emulsion containing the seaweed extract respectively. Moreover, the light did not affect the emulsion control meanwhile for the emulsion containing the seaweed extract, the pH was slightly lower under the light than in the dark, with 3.8 and 3.9, respectively. Cosmetic products must have a pH that keeps the skin balance: if the difference in pH is too large, it is possible to add pH regulators to adjust such as organic acid or potassium hydroxide.

Detection of phlorotannins by ^1H NMR









- The skin care emulsion

Interestingly, we were able to detect phlorotannins signals around 6 ppm within the skin care emulsion (Fig. 1). At 1% of seaweed extract, a bump was observed in this area (Fig. 1C) but at 5%, the signal was more noticeable (Fig. 1D). This step allowed us to implement the stability monitoring following the presence of aromatic/phenolic signals in the emulsion using ^1H NMR fingerprints all along the 180-day storage.

- Stability monitoring

Thanks to the NMR analyses, we followed the quality and the quantity (size of signals) of the phlorotannins included within the skin care emulsion during the 180-day storage. It is the first time that phenolic compounds present inside a cosmetic emulsion is followed by the NMR methodology. Fig. 2 shows all spectra of the emulsion after different time and conditions with a focus in the aromatic area, between 6.6 and 5.7 ppm. Three large zones were observed between 6.6/6.4, 6.4/6.1 and 6.1/5.85 ppm.

Table 2: Variations of the color and pH of a skin care emulsion without seaweed extract (control) or with a seaweed extract between the day of formulation (D0) and after 30, 90 and 180 days of storage (D30, D90 and D180 respectively) regarding the different conditions of storage: different temperatures (4°C, room temperature (RT; 18-20°C) or 50°C) and different light conditions, i.e. in the dark (a moon) or in light (a sun). The color was evaluated thanks to a Pantone Color Guide

	Skin care emulsion without seaweed extract (control)				Skin care emulsion with seaweed extract			
	4°C	RT	RT	50°C	4°C	RT	RT	50°C
								
D0	Snow White, pH 5.5				Lead Gray/Tree House, pH 4.6			
D30	Snow White				Lead Gray/ Tree House	Lead Gray	Lead Gray	Partridge
D90	Snow White	Pristine		Alabaster Gleam	Sepia Tint	Ermine		Bison
D180	Snow White, pH 4.9	Pristine, pH 4.8	Pristine, pH 4.9	Alabaster Gleam, pH 4.0	Ermine, pH 4.0	Toasted Coconut, pH 3.9	Toasted Coconut, pH 3.8	Bison, pH 3.5

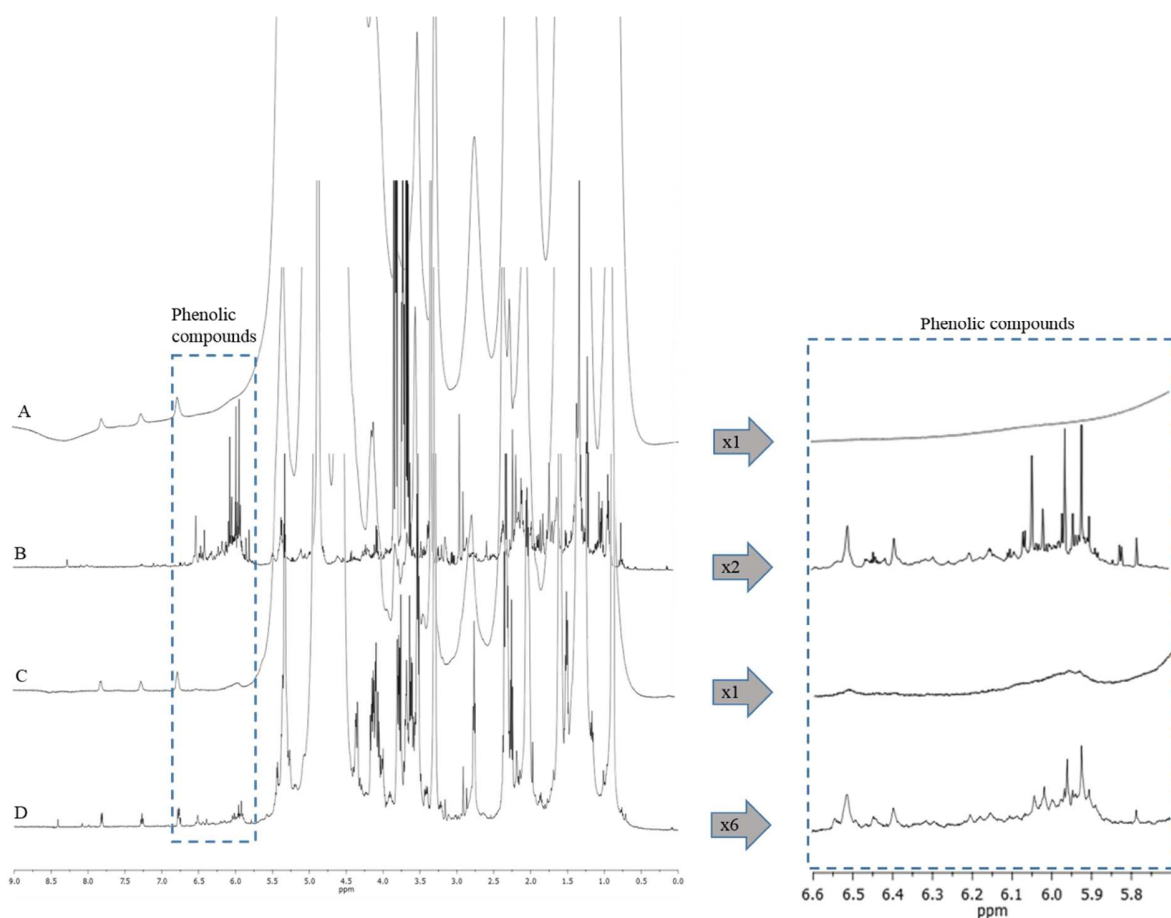


Figure 1: ^1H NMR spectra of the skin care emulsion without the seaweed extract (A), the brown seaweed extract (B) and the skin care emulsion with the seaweed extract at 1% (C) or 5% (D) between 9 and 0 ppm on the left and zoomed between 6.6 and 5.7 ppm (corresponding to the phenolic compounds) on the right.

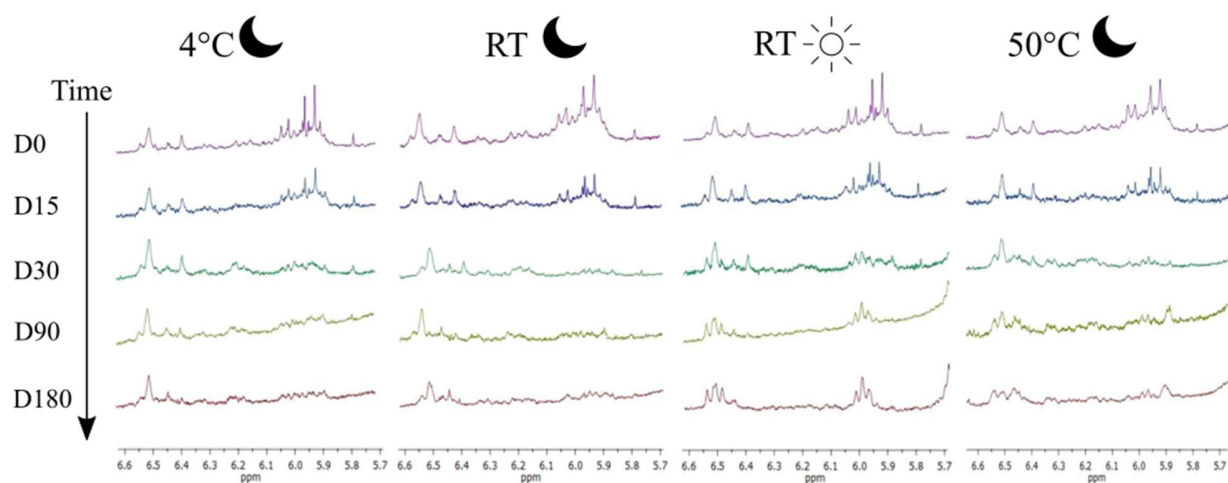


Figure 2: ^1H NMR spectra focusing on the aromatic/phenolics area (between 6.6 and 5.7 ppm) for the different storage conditions of the skin care emulsion: at 4°C in the dark, at room temperature (RT) in the dark or light and at 50°C in the dark; and over time D0 and after 15 (D15), 30 (D30), 90 (D90) and 180 (D180) days of storage. The moon corresponds to dark and the sun to light condition.

A fourth zone was observed with a peak at 5.8 ppm. Concerning the first zone, the signal was well preserved at 4°C and room temperature in the dark but the number of peaks were modified after 90 days of storage. A new peak conformation emerged after 90 days for the skin care emulsion exposed to light at room temperature but also at high temperature (50°C). The second zone was a bump observed whatever the condition and the storage. For the third area, signals were similar between D0 and D15 whatever the condition. Surprisingly, a significant drop in signals appeared after 30 days of storage, even at 4°C. The profiles of the spectra were similar between 90 and 180 days of storage. Three peaks appeared at room temperature with light and one at 50°C.

The peak in the fourth zone disappeared after 30 days of storage, especially at room temperature

and 50°C. After 180 days of storage, the peak disappeared completely.

To resume, a strong decrease in the peaks in the aromatic area was observed especially after 30-day storage. The modification of the shape of several peaks over time, especially at light and at high temperature, could be due to some degradation of the phenolic compounds or to an interaction of the phenolics with an ingredient of the emulsion.

Folin-Ciocalteu assay

The TPC of the crude extract, before its inclusion within the emulsion was 246.4 mg.g⁻¹ of extract. As all the 5% of the extract was solubilized in the skin care emulsion, the TPC inside the emulsion is then in theory 12.3 mg.g⁻¹ of emulsion.

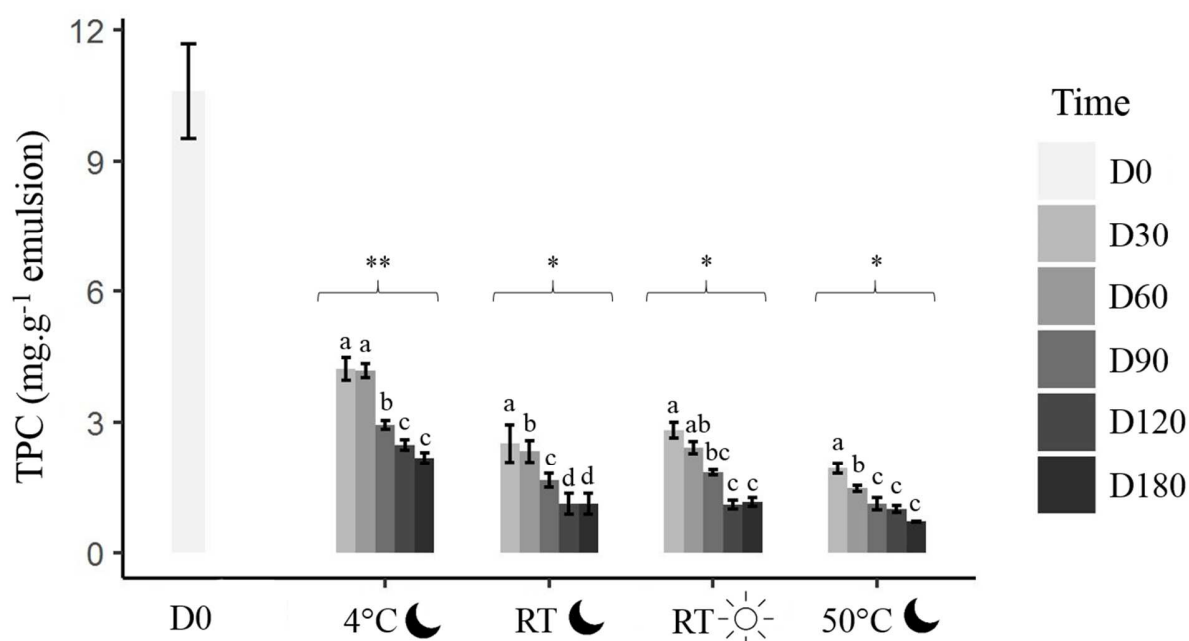


Figure 3: Total Phenolic Content (TPC) measured in the skin care emulsion containing 5% of seaweed extract and stored under different conditions (at room temperature (RT) in the light or in the dark, at 4°C or at 50°C, both in the dark) over time (Day 0=D0), 30 days (D30) to 180 days (D180)). Letters and *: significant differences between the different times when focalized on one condition and between the different conditions, respectively. The moon corresponds to dark and the sun to light.

Fig. 3 shows that TPC at the day of the formulation (D0) was equal to $10.6 \pm 1.1 \text{ mg.g}^{-1}$ of emulsion, almost what we were expecting. Surprisingly after 30 days of storage and as observed on the NMR analyses, a huge decrease in this TPC was highlighted whatever the condition. After 30 days of storage, TPC loss of 60 and 82% was observed at 4°C and 50°C respectively. At room temperature, the loss is intermediate with 76% under the light and 73% in the dark with no significant difference between both light conditions (One-way ANOVA, $p = 0.96$). Afterwards, the TPC decreased more weakly until 93% after 180 days for the warmest condition (accelerated ageing of the cream). From 30 days and up to 180 days of storage, the decrease in the TPC was higher at 50°C followed by the cream at room temperature (in the light and in the dark) and finally 4°C. There is a significant difference between the cold condition and the two other temperatures, room and warm conditions (One-way ANOVA, $p < 0.001$). Temperature had thus a significant impact on the stability of TPC meanwhile the light does not appear to affect the TPC.

Cuong et al. [18] observed a similar decrease in TPC in six *Sargassum* species dried extracts during a 730-day period at 30-day intervals. After 365-day storage, all extracts exhibited a decrease in TPC depending on the species between 23% and 63%. The decrease in TPC continued after 730 days of storage with a decrease between 51% and almost 100%. Cuong et al. [31] introduced 1% of *Sargassum serratum* extract in a beverage, and worked with a phlorotannin content in 200 mL beverages at 30 mg phloroglucinol equivalents. After 365-day storage at room temperature or at 5-10°C, they highlighted a decrease in phlorotannin content of 34% and 25% respectively. Our results are then in line with those obtained in the literature. One should hypothesized that outside of the macroalgal tissues and included within an emulsion, phlorotannins which are considered as

unstable compounds, degrade in the emulsion we prepared in this study. Maybe, a purified fraction without pigments or others molecules could be more stable as for Choi et al [22]. As explained before, the chemical structure of phlorotannins could impact the stability with more stability with the presence of dibenzodioxide link than ether and/or an aryl-aryl bond. It will be then interesting to test which ingredient, within the emulsion, is responsible for the decrease in TPC and also find other way to preserve the active ingredients within the galenic such as an inclusion into a small compartment.

Radical-scavenging activity

The radical-scavenging activity of the emulsion containing 5% of the seaweed extract during the first day of formulation was 72% (Fig. 4). Cuong et al. [31] introduced 1% of *Sargassum serratum* extract in a beverage and showed a DPPH free radical scavenging activity with 68% of inhibition. In our present work, as observed for TPC, a decrease in the activity was observed whatever the conditions, after 120 and 180 days of storage (Fig. 4). The decrease in antioxidant activity was higher for 50°C than room temperature or 4°C. Indeed, 41% of the activity were lost at 4°C meanwhile 69% at 50°C after 120-day storage. The percentage of loss was intermediate at room temperature with a loss of 62% in the light and 60% in the dark with no significant difference between the two light conditions (One-way ANOVA, $p = 0.96$). After a 180-day storage period, the loss of activity was equivalent at room and warm temperatures with 74% and 75% of loss respectively whereas the loss was lower at 4°C with 55%. As for TPC, there was a strong significant difference between the cold condition and the two other temperatures, room and warm conditions (One-way ANOVA, $p < 0.0001$).

On the other hand, some publications showed the stability of the antioxidant activity on dried extracts. For example, Cuong et al. [18] observed antioxidant activities of six *Sargassum* species extracts during a 730-day period at 30-day intervals. After 365-day storage, the extracts exhibited a decrease in the total antioxidant activity, reducing power activity and DPPH free radical scavenging activity, between 26 - 66%, 23 - 61% and 24 - 61%, respectively. The decrease in antioxidant activities continued strongly after the 730-day storage period with a complete loss of

after 7 days. The authors concluded that purified fractions are more stable than crude extract, almost during the 7-day period. Those examples concerned dried extracts monitored over time, without being included in a matrix. One should hypothesized that the stability of these extracts could be different if they will be included within a formulation. For example, after 360 days of storage at room temperature, total antioxidant and reducing power activities of a beverage containing 1% of a *Sargassum serratum* extract decreased by 36% and 43% respectively compared to the initial

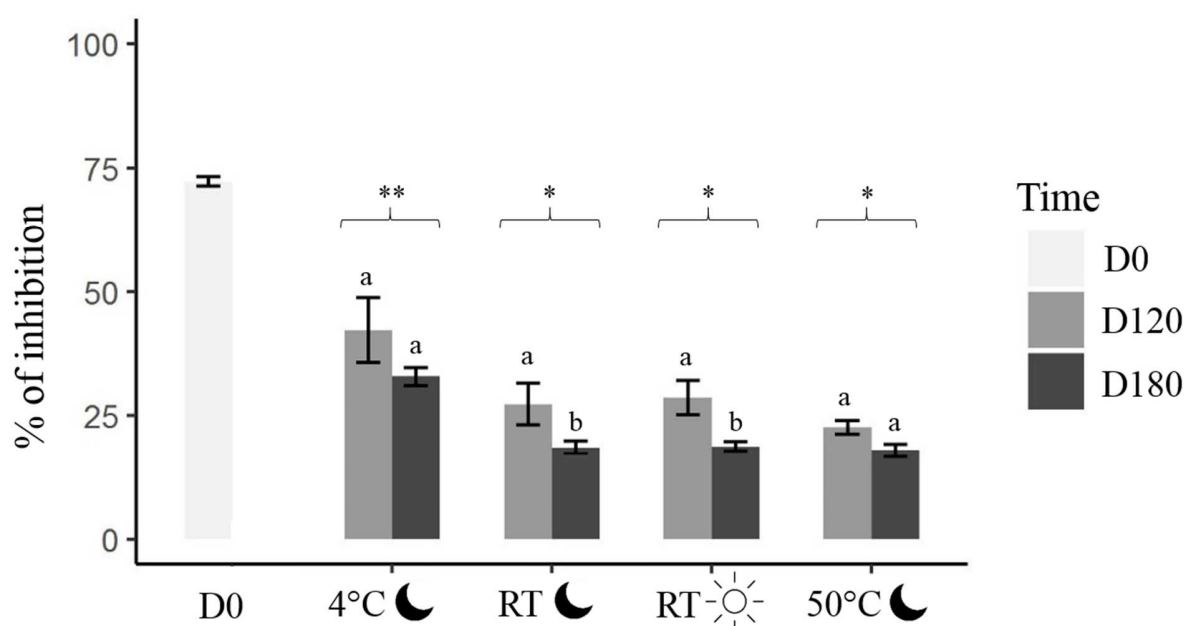


Figure 4: Radical-scavenging activity of a skin care emulsion containing a seaweed extract and stored under different conditions: at 4°C in the dark, at room temperature in the dark or under the light, and at 50°C in the dark, and evaluated the day of the formulation (D0) and after 120 (D120) and 180 days (D180) of storage. The activity was expressed as % of inhibition of free radicals. Letters and *: significant differences between the different times when focalized on one condition and between the different conditions, respectively. The moon corresponds to dark and the sun to light.

activities. Additionally, Kang et al. [17] studied the thermostability of a dieckol, isolated from *Ecklonia cava*, in the dark at 30, 60 and 90°C for 7 days. The hydroxyl and DPPH radical scavenging activities showed no significant difference at the three temperatures with 80% of activities whereas the positive control, ascorbic acid, showed a decreasing activity down to an absence of activity

beverages [31]. The loss of activities is less important at cold temperature storage (5-10°C) with a decrease of 25% and 24% and respectively. Those results are in agreement with our results. Nevertheless, some previous publications have shown the potential antioxidant role of phlorotannins towards the lipid oxidation inside the emulsion during the storage. Balboa et al. [32]

showed the stability of suncream formulations during 34 days at 50°C and especially a reduction in the lipid oxidation of the cream with the addition of a *Sargassum muticum* extract, and the cream stability was even greater with the algal extract than the positive control, tocopherol. This result was validated by Poyato et al. [24] who showed that the presence of highly antioxidant phlorotannin in the extracts allowed the decrease in the lipid oxidation. As for the TPC variation, one should hypothesized that the level of purification and the chemical structure of phlorotannins could explained the variable stability within the emulsion. Indeed, the literature demonstrated that eckols-type compounds of a purified fraction remain active while phlorotannins of a crude extract from Fucales in our study lost activity when included within the emulsion. This decrease in phenolic level and associated activity could be the result of the antioxidant capacity of phenolic which may protect the cream. It will be then necessary to test also here which ingredient within the emulsion could be at the origin of the decrease in the activity through its oxidation.

Conclusion

Our study shows for the first time qualitative and quantitative analyses of phenolic compounds extracted from a brown seaweed, *Halidrys siliquosa*, and interestingly, included within a skin care emulsion. Thanks to our procedure, it is easy to follow the presence of active phenolic compounds within a cosmetic product and to quantify them as a traceability tool. Several conditions of storage were tested to realize a stability monitoring. The temperature at 4°C seemed to be the best condition to maintain active phenolic compounds inside the emulsion. The storage in the light did not appear to affect the active phenolic compounds during the storage. Interesting aspects which could be tested for the future are to find within this present formulation which ingredient is at the origin of the decrease in

TPC and activity, but also to test another composition of cream or another galenic (aqueous solution, oil solution, mask, etc) in which phlorotannins could be formulated. Also instead of using an extract enriched in phlorotannins, a purified phlorotannin could be included in a galenic and its stability could be monitored as for the extract here to see if it would evolve in the same way. Finally, other means of preserving the active ingredients could also be tested, such as an encapsulation of phenolic compounds in the galenic.

Acknowledgments

This paper is part of the work carried out by the first author, LG, in the FUI20 applied project RIV-AGE2.0 of which the Laboratory of Marine Environmental Science (LEMAR) set at the IUEM (UBO), is a partner. It is supported by UBO, the Brittany region, the Finistère Department and Brest Métropole. Authors would like to thank Jean-François Arbona and Magali Molla from C-WEED Aquaculture for the supply of seaweed.

References

- [1] E. Shalaby, Algae as promising organisms for environment and health, *Plant Signal. Behav.* 6 (2011) 1338–1350. doi:10.4161/psb.6.9.16779.
- [2] D.B. Stengel, S. Connan, Z.A. Popper, Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 483–501. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.016.
- [3] D.B. Stengel, S. Connan, Marine Algae: a source of biomass for biotechnological applications, in: D.B. Stengel, S. Connan (Eds.), *Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols*, Springer Science (2015) pp. 103–108. doi:10.1007/978-1-4939-2684-8.
- [4] H.M.D. Wang, C.C. Chen, P. Huynh, J.S. Chang, Exploring the potential of using algae in cosmetics, *Bioresour. Technol.* 184 (2015) 355–362. doi:10.1016/j.biortech.2014.12.001.

- [5] M.B. Ariede, T.M. Candido, A.L.M. Jacome, M.V.R. Velasco, J.C.M. de Carvalho, A.R. Baby, Cosmetic attributes of algae - A review, *Algal Res.* 25 (2017) 483–487. doi:10.1016/j.algal.2017.05.019.
- [6] V. Stiger-Pouvreau, F. Guérard, Bio-inspired molecules extracted from marine macroalgae: a new generation of active ingredients for cosmetics and human health, in: S. La Barre, S.S. Bates (Eds.), *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2018) pp. 709–746.
- [7] J.Y. Berthon, R. Nachat-Kappes, M. Bey, J.P. Cadoret, I. Renimel, E. Filaire, Marine algae as attractive source to skin care, *Free Radic. Res.* 51 (2017) 555–567. doi:10.1080/10715762.2017.1355550.
- [8] C. Couteau, L. Coiffard, Seaweed Application in cosmetics, *Seaweed Heal. Dis. Prev.* (2016) 423–441. doi:10.1016/B978-0-12-802772-1.00014-2.
- [9] J.A. Geiselman, O.J. McConnell, Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: Chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*, *J. Chem. Ecol.* 7 (1981) 1115–33. doi:10.1007/BF00987632.
- [10] J.G. Jennings, P.D. Steinberg, Phlorotannins versus other factors affecting epiphyte abundance on the kelp *Ecklonia radiata*, *Oecologia.* 109 (1997) 461–473. doi:10.1007/s004420050106.
- [11] A.K. Swanson, L.D. Druehl, Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins, *Aquat. Bot.* 73 (2002) 241–253. doi:10.1016/S0304-3770(02)00035-9.
- [12] Y.X. Li, W. Isuru, L. Yong, K. Se-Kwon, Phlorotannins as bioactive agents from brown algae, *Process Biochem.* 46 (2011) 2219–2224. doi:10.1016/j.procbio.2011.09.015.
- [13] V. Stiger-Pouvreau, C. Jégou, S. Cérantola, F. Guérard, Le Lann, Phlorotannins in Sargassaceae Species from Brittany (France): interesting molecules for ecophysiological and valorisation purposes, in: N. Bourgoignon (Ed.), *Advances in Botanical Research, Sea Plants*, Elsevier, 2014: pp. 379–41181. doi:10.1016/b978-0-12-374711-2.00705-1.
- [14] K. Le Lann, G. Surget, C. Couteau, L. Coiffard, S. Cérantola, F. Gaillard, M. Larnicol, M. Zubia, F. Guérard, N. Poupart, V. Stiger-Pouvreau, Sunscreen, antioxidant, and bactericide capacities of phlorotannins from the brown macroalga *Halidrys siliquosa*, *J. Appl. Phycol.* 28 (2016) 3547–3559. doi:10.1007/s10811-016-0853-0.
- [15] K. Le Lann, C. Jégou, V. Stiger-Pouvreau, Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: Comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R. Ross, *Phycol. Res.* 56 (2008) 238–245. doi:10.1111/j.1440-1835.2008.00505.x.
- [16] E. Cruces, E. Atala, I. Gomez, Comparison of different techniques for the preservation and extraction of phlorotannins in the kelp *Lessonia spicata* (Phaeophyceae): assays of DPPH, ORAC-PGR and ORAC-FL as testing methods, *J. Appl. Phycol.* 28 (2016) 573–580. doi:10.1007/s10811-015-0602-9.
- [17] M.-C. Kang, E.-A. Kim, S.-M. Kang, W. a. J.P. Wijesinghe, X. Yang, N.-L. Kang, Y.-J. Jeon, Thermostability of a marine polyphenolic antioxidant dieckol, derived from the brown seaweed *Ecklonia cava*, *Algae.* 27 (2012) 205–213. doi:10.4490/algae.2012.27.3.205.
- [18] D.X. Cuong, V.N. Boi, T.T.T. Van, L.N. Hau, Effect of storage time on phlorotannin content and antioxidant activity of six *Sargassum* species from Nhatrang Bay, Vietnam, *J. Appl. Phycol.* 28 (2016) 567–572. doi:10.1007/s10811-015-0600-y.
- [19] B. Joy, M. Kuruvilla, Screening of *Turbinaria* for the presence and stability of antimicrobial compounds, *Eur. J. Pharm. Med. Res.* 4 (2017) 400–408.
- [20] D.A. Kirke, T.J. Smyth, D.K. Rai, O. Kenny, D.B. Stengel, The chemical and antioxidant stability of isolated low molecular weight phlorotannins, *Food Chem.* 221 (2017) 1104–1112. doi:10.1016/j.foodchem.2016.11.050.

- [21] M. Padilla, M. Palma, C.G. Barroso, Determination of phenolics in cosmetic creams and similar emulsions, *J. Chromatogr. A.* 1091 (2005) 83–88. doi:10.1016/j.chroma.2005.07.041.
- [22] J. Choi, K. Lee, B. Lee, Y. Kim, K.K. Cho, Safety, functionality and stability tests of *Ecklonia cava* extract for dermal application, (2014) 1–6. doi:10.1007/s13530-014-0189-6.
- [23] E. Balboa, E. Conde, A. Constenla, E. Falqué-López, H. Domínguez, Sensory evaluation and oxidative stability of a sunscreen formulated with thermal spring waters from Ourense (NW Spain) and *Sargassum muticum* extracts, *Cosmetics.* 4 (2017) 19. doi:10.3390/cosmetics4020019.
- [24] C. Poyato, B.R. Thomsen, D.B. Hermund, D. Ansorena, I. Astiasarán, R. Jónsdóttir, H.G. Kristinsson, C. Jacobsen, Antioxidant effect of water and acetone extracts of *Fucus vesiculosus* on oxidative stability of skin care emulsions, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118 (2016) 1–11. doi:10.1002/ejlt.201600072.
- [25] N. Liu, X. Fu, D. Duan, J. Xu, X. Gao, L. Zhao, Evaluation of bioactivity of phenolic compounds from the brown seaweed of *Sargassum fusiforme* and development of their stable emulsion, *J. Appl. Phycol.* 30 (2018) 1955–1970. doi:10.1007/s10811-017-1383-0.
- [26] C. Anchisi, A.M. Maccioni, C. Sinico, D. Valenti, Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agents, *Farmaco.* 56 (2001) 427–431. doi:10.1016/S0014-827X(01)01055-2.
- [27] M. Zubia, M.S. Fabre, V. Kerjean, K.L. Lann, V. Stiger-Pouvreau, M. Fauchon, E. Deslandes, Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts, *Food Chem.* 116 (2009) 693–701. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.025.
- [28] G. Surget, V. Stiger-Pouvreau, K. Le Lann, N. Kervarec, C. Couteau, L.J.M. Coiffard, F. Gaillard, K. Cahier, F. Guérard, N. Poupert, Structural elucidation, *in vitro* antioxidant and photoprotective capacities of a purified polyphenolic-enriched fraction from a saltmarsh plant, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 143 (2015) 52–60. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.12.018.
- [29] D.B. Hermund, S.Y. Heung, B.R. Thomsen, C.C. Akoh, C. Jacobsen, Improving oxidative stability of skin-care emulsions with antioxidant extracts from brown alga *Fucus vesiculosus*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 95 (2018) 1509–1520. doi:10.1002/aocs.12156.
- [30] H. Lambers, S. Piessens, A. Bloem, H. Pronk, P. Finkel, Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora, *Int. J. of Cosm. Sc.* (2006) 359–370.
- [31] D.X. Cuong, N. Van Thanh, V.N. Boi, Stability of antioxidant phlorotannin beverage originated from *Sargassum serratum* on the storage time and temperature, *Can Tho Univ. J. Sci.* 54 (2018) 9–17. doi:10.22144/ctu.jen.2018.002.
- [32] E.M. Balboa, M.L. Soto, D.R. Nogueira, N. González-López, E. Conde, A. Moure, M.P. Vinardell, M. Mitjans, H. Domínguez, Potential of antioxidant extracts produced by aqueous processing of renewable resources for the formulation of cosmetics, *Ind. Crops Prod.* 58 (2014) 104–110. doi:10.1016/j.indcrop.2014.03.04

Supplementary data

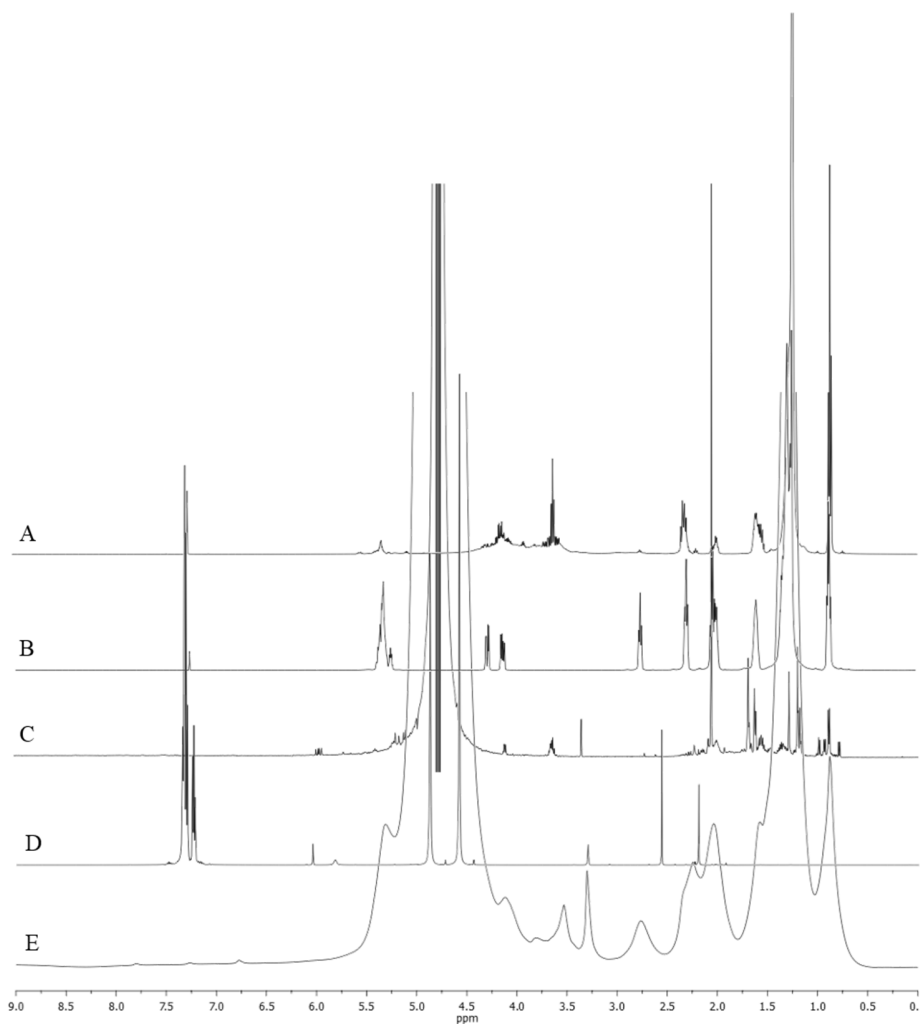


Figure S1: ^1H NMR spectra of the different ingredients of the skin care emulsion: emulsifier in deuterated chloroform (A), organic *Aloe vera* oil macerate in deuterated chloroform (B), geranium hydrolate in deuterated water (C), the preservative Cosguard in deuterated methanol (D) and the skin care emulsion in deuterated methanol (E).

4 Brevet : extraits d'algues brunes comprenant des composés phénoliques et leurs utilisations cosmétiques

Dans le cadre du projet RIV-AGE 2.0 et de mon étude, une demande de dépôt brevet a été effectuée, portant le numéro FR1904486, suite aux résultats sur les extraits d'algues brunes enrichies en composés phénoliques obtenus par des méthodes d'extraction sous pression. Ce brevet a été déposé le 26 avril 2019 et a permis ainsi de libérer la publication des résultats de cette étude. Il s'intitule « Extraits d'algues brunes comprenant des composés phénoliques et leurs utilisations cosmétiques ». Les inventeurs sont V. Stiger-Pouvreau, S. Connan, L. Gager, L. Coiffard, C. Couteau, S. Decoster, L.-N. Gombault, C. Cotterel et A. Mahé. Les propriétaires de ce brevet sont l'Université de Bretagne Occidentale (UBO), l'Université de Nantes (UN), le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD), l'IFREMER, Chimex et Technature. Cette demande de dépôt de brevet a été réalisée par l'aide de la SATT Ouest Valorisation (Société d'Accélération du Transfert de Technologies) qui assure la valorisation des résultats de la recherche publique. Le brevet est rendu public 18 mois après le dépôt soit en octobre 2020.

Voici les différentes étapes d'un brevet détaillé (détaillées sur le site de <https://www.inpi.fr/fr>) et représentée sur la [Figure 4-15](#) :

- **Dépôt** du brevet auprès de l'Institut National de la Propriété Industrielle (INPI) par un cabinet mandaté
- Suite à la demande de dépôt, l'INPI envoie le numéro d'enregistrement national et la date du dépôt correspondant au brevet
- Transmission par l'INPI de la demande à la Défense nationale pour examen (étape imposée par la loi pour vérifier si l'invention ne présente pas un intérêt pour la nation)
- L'INPI examine la demande de dépôt de brevet de manière administrative ainsi que technique
- **Rapport de recherche préliminaire** et avis sur la brevetabilité de l'invention envoyés aux demandeurs
- Publication de la demande de brevet au Bulletin officiel de la propriété industrielle (BOPI) et sur le registre des brevets de l'INPI, **18 mois** après le premier dépôt de la demande
- Avis de publication envoyé aux demandeurs
- **Rapport de recherche définitif** établi par l'INPI : examen du dossier terminé
- Paiement de la redevance de délivrance et d'impression du fascicule du brevet
- **Délivrance** du brevet par l'INPI qui adresse un exemplaire aux demandeurs, et publie la mention de la délivrance au BOPI. Le délai moyen de délivrance des brevets par l'INPI est de **27 mois**.

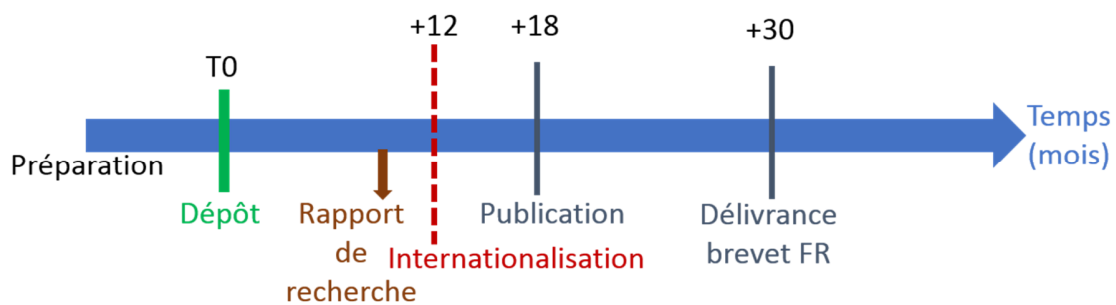
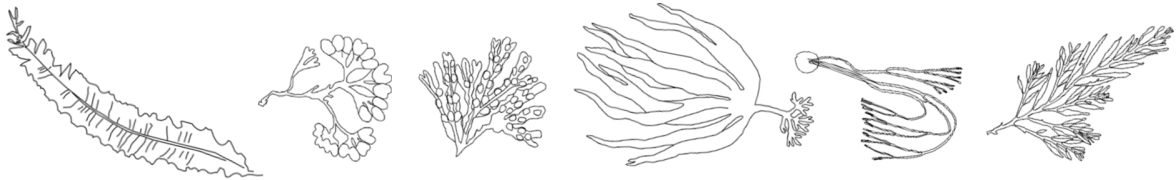


Figure 4-15: Les différentes étapes d'une demande de dépôt de brevet auprès de l'Institut National de la Propriété Industrielle (INPI), inspiré de <https://www.ipside.com/fr>



Conclusions et perspectives



Ce travail, concernant les différentes étapes d'obtention d'un extrait actif à partir de macroalgues brunes pour la cosmétique, a porté sur les problématiques suivantes :

- Quel type d'extraction/purification éco-responsable permet d'obtenir des fractions enrichies en composés phénoliques actifs ? Ces méthodes permettent-elles d'identifier les composés phénoliques ? (Chapitre 2)
- Quel type de biomasse algale est intéressant pour une valorisation industrielle ? Selon la biomasse sélectionnée, est-elle en quantité suffisante et possède-t-elle assez de composés phénoliques ? Si oui, y-a-t'il des variations temporelles de ces teneurs ? (Chapitre 3)
- Est-il possible de valoriser ces algues en cosmétique pour leur activité anti-âge ? Ces extraits sont-ils stables dans le temps seul et incorporé dans une galénique ? (Chapitre 4)

Pour répondre à ces diverses problématiques, la première partie de ce travail a eu pour but de tester de nouvelles méthodes d'extraction éco-responsables sur différentes algues brunes et trouver une méthode d'identification des composés phénoliques. La seconde partie a consisté à établir un socle de connaissance pour permettre une valorisation industrielle de la biomasse algale brune bretonne et notamment sur l'étude de la variabilité temporelle des composés phénoliques chez les algues brunes et la valorisation d'une biomasse nouvelle, les cellules au stade précoce. La troisième s'est axée sur la valorisation cosmétique à la recherche d'activités anti-âge en optimisant des tests *in vitro* et en étudiant la stabilité des composés phénoliques dans une crème cosmétique. L'ensemble de ces travaux a permis de faire progresser la réflexion et les connaissances scientifiques sur les points suivants :

- Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques, alternatives aux méthodes classiques.
- Des espèces d'algues brunes abondantes en Bretagne valorisables tout au long de l'année pour leur teneur en composés phénoliques actifs.
- Le fort potentiel de valorisation en cosmétique des composés phénoliques des algues brunes du fait de leurs activités anti-âge et leur stabilité.

Des méthodes d'extraction et de purification éco-responsables des composés phénoliques, alternatives aux méthodes classiques

Dans la première partie de ce travail (Chapitre 2), nous nous sommes intéressés à des méthodes d'extraction et de purification des composés phénoliques alternatives aux méthodes classiques existantes dans le but d'être plus éco-responsable. Ainsi, dans un premier temps, nous avons étudié comme méthode d'extraction, l'extraction accélérée par solvant (ASE) et comme méthodes de purification, la Flash-Chromatographie (FC), l'extraction en phase solide (SPE) et la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC). Nous avons montré que :

- La température a une influence lors de l'extraction par ASE d'*A. nodosum* et *H. siliquosa*, avec une teneur en composés phénoliques (TCP) plus élevée à 150°C comparativement à 75 et 100°C ; à l'inverse, le nombre de cycles n'a pas montré d'impact sur la TCP, nous préconisons donc de choisir le nombre de cycles le plus faible, c'est-à-dire 1 cycle, pour gagner en rapidité, en énergie dépensée et en quantité de solvant utilisée et donc gagner en productivité et éco-responsabilité.
- Deux méthodes de purification utilisant des colonnes par séparation de polarité ont permis de concentrer la TCP, comparativement à l'extrait brut de départ, de 2 fois plus pour *H. siliquosa* et de 1,8 fois plus pour *A. nodosum* avec la SPE et de 2,5 fois plus pour *H. siliquosa* avec la FC.
- Des expériences préliminaires sur la CPC n'ont pas permis de concentrer la TCP comparativement à l'extrait brut de départ.
- La méthode d'extraction ASE a montré une productivité plus intéressante que la méthode classique (macération) tandis que les deux méthodes de purification par colonne (SPE et FC) ont montré une productivité plus élevée que la méthode de purification classique (purification liquide/liquide).

Des perspectives peuvent être envisagées sur ces différentes méthodes comme valider les méthodes de purification par SPE et FC sur d'autres espèces d'algues n'ayant pas les mêmes phlorotannins. Par ailleurs, d'autres essais seraient intéressants à mener avec la méthode de CPC puisque c'est une méthode qui peut concentrer jusqu'à 90% un extrait (Lee et al., 2014). Il serait intéressant de modifier les paramètres, tels que le mode descendant plutôt qu'ascendant, un autre système solvant, ou encore une dissolution de l'extrait à analyser dans le système solvant. En effet, c'est une méthode qui peut être facilement industrialisable et donc intéressante à optimiser.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux méthodes de séparation et d'identification par la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et la spectrométrie de masse par le MALDI-TOF/TOF. Nous avons montré :

- Une séparation possible des composés phénoliques par la méthode HPLC mise en place.
- La présence de phlorotannins à différents degrés de polymérisation (entre 7 et 14) dans une fraction purifiée enrichie en CP de *Fucus serratus* grâce à une méthode de spectrométrie de masse avec le MALDI-TOF/TOF.

Quelques perspectives peuvent être mises en place concernant ces méthodes : pour l'HPLC, comprendre l'apparition et la disparition de certains pics pour certaines fractions passées à la suite et surtout valider la méthode HPLC par un autre détecteur : le spectromètre de masse. En effet, nous supposons réussir à séparer les composés phénoliques par HPLC, la spectrométrie de masse nous permettra de déterminer la masse des composés et valider la présence des CP. Des premiers tests réalisés avec un spectromètre du LEMAR, Orbitrap, n'a pas montré de résultats pour l'instant, le phloroglucinol n'étant même pas détecté. Des expériences plus approfondies à ce sujet pourront être mises en place avec notamment un autre type spectromètre (ionisation par électronébuliseur, ESI) bientôt présent à la plateforme de spectrométrie à l'UBO. Concernant le MALDI-TOF/TOF, un seul spectre a réussi à être obtenu, d'autres essais doivent donc être poursuivis en essayant de rester tout le temps dans les mêmes conditions environnementales pour permettre une cristallisation de l'échantillon identique à chaque essai (sous cloche sous azote ?). Par ailleurs, il serait intéressant de définir 2 matrices en parallèle : une pour identifier les CP de haut poids moléculaire, une autre pour les CP de plus faible poids moléculaire ce qui permettrait d'éviter d'avoir la matrice sur le spectre pouvant cacher de nombreux autres signaux. D'autre part, la puissance du détecteur a peut-être diminué due à son âge (10 ans) : après une vérification de l'appareil il serait intéressant de repasser à nouveau des échantillons.

Des espèces d'algues brunes abondantes en Bretagne valorisables tout au long de l'année pour leur teneur en composés phénoliques

Dans cette seconde partie de ce travail (Chapitre 3), nous nous sommes intéressés à la biomasse algale valorisable en industrie. Dans un premier temps, nous avons étudié 3 algues brunes bretonnes à leur stade précoces (SP) et microscopiques pour pouvoir les cultiver à terre sous conditions contrôlées et non en mer pour s'affranchir de la récolte et de l'effet des variations environnementales sur les composés. Nous avons pu mettre en évidence :

- Une teneur en CP plus élevée chez les SP d'*Undaria pinnatifida* lorsqu'ils sont congelés voir lyophilisés plutôt que frais ou séchés à l'étuve. Cependant, de très faibles teneurs en CP ont été mises en avant, avec la plus forte teneur obtenue par macération à l'éthanol absolu.

- Les techniques de fragmentation et une orientation métabolique sous UVA n'ont pas permis d'extraire davantage les CP des SP chez *Undaria pinnatifida* et *Ectocarpus siliculosus*.

Des perspectives peuvent être envisagées pour la valorisation de ces SP : en effet, c'est une biomasse innovante et intéressante pour le domaine industriel, cependant leur teneur en CP n'étant pas assez élevée, il faudrait rechercher d'autres molécules actives mais plus abondantes chez ces SP et tester d'autres orientations métaboliques pour permettre d'augmenter la concentration en ces molécules.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressées à la variation temporelle des composés phénoliques chez 7 algues brunes sauvages bretonnes. Nous avons pu mettre en évidence :

- Une forte teneur en CP chez les Fucales et notamment *Ascophyllum nodosum*, *Fucus serratus*, *Halidrys siliquosa* et *Himanthalia elongata*, comparativement aux Laminariales.
- Une variation temporelle chez certaines espèces comme *Himanthalia elongata*, *Bifurcaria bifurcata* et *Alaria esculenta* avec une TCP plus élevée en automne, *Laminaria ochroleuca* au printemps, *Ascophyllum nodosum* avec une plus faible TCP au printemps et pas de variation temporelle observée chez *Fucus serratus* et *Halidrys siliquosa*.

Des perspectives peuvent être menées sur les algues sélectionnées lors du projet RIV-AGE pour continuer le suivi des CP dans le temps et notamment au-delà du projet et de cette thèse.

Fort potentiel de valorisation cosmétique des composés phénoliques des algues brunes : activités anti-âge et stabilité

Dans cette troisième partie (Chapitre 4), nous nous sommes intéressés au potentiel de valorisation en cosmétique des composés phénoliques des algues brunes bretonnes. Pour cela, dans un premier temps nous avons mis en place deux tests enzymatiques permettant d'évaluer l'activité anti-âge de nos composés. Nous avons :

- Optimisé deux tests d'activités anti-âges : le test anti-élastase et le test anti-tyrosinase.
- Testé des extraits et fractions d'*Ascophyllum nodosum* et de *Fucus serratus* qui ont montré ces deux activités anti-âge, similaire au témoin positif pour l'activité anti-élastase notamment.

En perspective, ces tests d'activité pourront être appliqués sur les différentes fractions obtenues par les différentes méthodes d'extraction et valider ainsi le potentiel anti-âge de ces algues.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la stabilité des composés phénoliques dans le temps pour pouvoir les valoriser en cosmétique. Nous avons :

- Montré une meilleure stabilité de la TCP à -20°C ou 4°C et à l'obscurité pour les extraits secs : il est donc préconisé de conserver les extraits au froid et à l'abri de la lumière dans un packaging opaque par exemple, pour garder l'intégrité des CP.
- Utilisé la RMN du proton pour analyser les composés phénoliques dans une crème cosmétique
- Observé une diminution drastique des composés phénoliques dès 1 mois de conservation dans la crème cosmétique, quelque soit la température ou la luminosité.

Quelques perspectives peuvent être mises en place : pour comprendre la chute importante des CP dans la crème, il serait intéressant de chercher si un ingrédient en particulier de la crème cosmétique provoque cette diminution en testant d'autres formulations cosmétiques. Par ailleurs, ce sont des extraits bruts qui ont été suivis pour leur stabilité, il serait intéressant de suivre la stabilité de fractions purifiées enrichie en CP qui ont montré dans la littérature une stabilité plus importante. Si les CP sont sensibles à la dégradation quelque soit le type de galénique utilisé en cosmétique, il est également possible d'envisager d'encapsuler l'extrait ou la fraction d'algue pour la protéger au sein de la formulation cosmétique.

Conclusion générale

Ce travail réalisé sur les algues brunes bretonnes riches en composés phénoliques a montré leur fort potentiel de valorisation pour l'industrie cosmétique. En effet, la recherche de nouveaux actifs d'origine naturelle est une voie prometteuse pour l'élaboration de nouveaux actifs cosmétiques innovants. Nos travaux présentent des avancées dans la connaissance des méthodes d'extraction et de purification des composés phénoliques d'algues, alternatives aux méthodes dites classiques. Ces méthodes s'inscrivent dans une démarche éco-responsable, qui à l'heure actuelle est indispensable ne serait ce que par les choix du consommateur. Par ailleurs, comme nous l'avons montré dans cette étude, pour pouvoir valoriser cette biomasse, il est nécessaire de réaliser une étude biologique pour appréhender les variations potentielles des métabolites d'intérêt dues aux facteurs environnementaux. Ces informations sont indispensables pour permettre une valorisation industrielle. D'autre part, cette étude a montré l'intérêt notable des composés phénoliques des algues brunes pour leurs propriétés antioxydantes, photoprotectrices et anti-âge. Enfin, avant de pouvoir utiliser un extrait ou une fraction d'algue dans une formulation cosmétique, il faut connaître la stabilité des composés d'intérêt dans le temps dans les différentes galéniques souhaitées. Cette étude permet de choisir le meilleur packaging pour conserver et garder l'intégrité des composés de l'extrait/fraction et de leurs activités associées au sein de la formulation.

Bibliographie

A

- Abdala-Díaz R.T., Cabello-Pasini A., Pérez-Rodríguez E., Conde Álvarez C. and Figueroa F.L. (2006) Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Marine Biology*, 148, 459–465
- Abirami, A., Uthra, S. and Arumugam, M. (2018). Nutritional value of seaweeds and their potential pharmacological role of polyphenolics substances: a review. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*, 5, 930-939.
- Aboulthana, W. M., El-Feky, A. M., Ibrahim, N. E. S., Sahu, R. K. and El-Sayed, A. E. K. B. (2018). Evaluation of the Pancreatoprotective; Effect of *Nannochloropsis oculata* extract against streptozotocin-Induced diabetes in rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8, 046-058.
- Abu-Ghannam, N. and Rajauria, G. (2013). Antimicrobial activity of compounds isolated from algae. In H. Dominguez (Ed), *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals* (pp. 287-306). Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D. H., Mcanus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. and Spiegel, F. W. (2012) The revised classification of Eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 5, 429-493.
- Agregán, R., Munekata, P. E., Domínguez, R., Carballo, J., Franco, D. and Lorenzo, J. M. (2017a). Proximate composition, phenolic content and *in vitro* antioxidant activity of aqueous extracts of the seaweeds *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata* and *Fucus vesiculosus*. Effect of addition of the extracts on the oxidative stability of canola oil under accelerated storage conditions. *Food Research International*, 99, 986-994.
- Agregán, R., Munekata, P. E. S., Franco, D., Dominguez, R., Carballo, J. and Lorenzo, J. M. (2017b). Phenolic compounds from three brown seaweed species using LC-DAD–ESI-MS/MS. *Food Research International*, 99, 979-985.
- Agregán, R., Munekata, P. E. S., Franco, D., Carballo, J., Barba, F. J. and Lorenzo, J. M. (2018). Antioxidant potential of extracts obtained from macro- (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*) and micro-algae (*Chlorella vulgaris* and *Spirulina plantensis*) assisted by ultrasound. *Medicines*, 5, 1-9.
- Ahmed, F., Fanning, K., Netzel, M., Turner, W., Li, Y. and Schenk, P. M. (2014). Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food chemistry*, 165, 300-306.
- Ahn, G., Amagai, Y., Matsuda, A., Kang, S. M., Lee, W. W., Jung, K. and Tanaka, A. (2015). Dieckol, a phlorotannin of *Ecklonia cava*, suppresses IgE-mediated mast cell activation and passive cutaneous anaphylactic reaction. *Experimental Dermatology*, 24, 968-970.
- Ahn, G. N., Kim, K. N., Cha, S. H., Song, C. B., Lee, J., Heo, M. S., Yei, I. K., Lee, N. H., Jee, T. H., Kim, J. S., Heu, M. S. and Jeon, Y. J. (2007). Antioxidant activities of phlorotannins purified from *Ecklonia cava* on free radical scavenging using ESR and H₂O₂-mediated DNA damage. *European Food Research and Technology*, 226, 71-79.
- Aisa, Y., Miyakawa, Y., Nakazato, T., Shibata, H., Saito, K., Ikeda, Y. and Kizaki, M. (2005). Fucoïdan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *American Journal of Hematology*, 78, 7–14.
- Ali, T. F. and Hasan, T. (2012). Phlorotannin-incorporated mesenchymal stem cells and their promising role in osteogenesis imperfecta. *Journal of Medical Hypotheses and Ideas*, 6, 85-89.
- Alves, C., Pinteus, S., Simões, T., Horta, A., Silva, J., Tecelão, C., & Pedrosa, R. (2016). *Bifurcaria bifurcata*:

- a key macro-alga as a source of bioactive compounds and functional ingredients. *International Journal of Food Science and Technology*, *51*, 1638–1646.
- American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, *33*, S62-S69.
- Amsler, C. D. (2012) Chemical ecology of seaweeds. In C. Wiecke & K. Bishof (Eds.) *Seaweed biology. ecological studies (Analysis and synthesis)* (pp 177-188), Volume 219, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Anchisi, C., Maccioni, A. M., Sinico, C. and Valenti, D. (2001). Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agents. *Farmaco*, *56*, 427–431.
- Andrade, L. R., Salgado, L. T., Farina, M., Pereira, M. S., Mourão, P. A. S. and Amado Filho, G. M. (2004). Ultrastructure of acidic polysaccharides from the cell walls of brown algae. *Journal of Structural Biology*, *145*, 216–225.
- ANSM, Agence Nationale de la Sécurité du Médicament et des produits de santé (2016) Questions/Réponses Réglementation cosmétique, 1-27.
https://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/2a0e1a35280c1f5e4bf15484f3d5435e.pdf
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K. and Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*, 997-1027.
- Arai, M., Shibata, Y., Pugdee, K., Abiko, Y. and Ogata, Y. (2007). Effects of reactive oxygen species (ROS) on antioxidant system and osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *IUBMB Life*, *59*, 27-33.
- Ar Gall, E., Lelchat, F., Hupel, M., Jégou, C. and Stiger-Pouvreau, V. (2015). Extraction and purification of phlorotannins from brown algae. In D. B. Stengel and S. Connan (Eds) *Natural Products from Marine Algae* (pp. 131-143), Humana Press, New York.
- Ariede, M. B., Candido, T. M., Jacome, A. L. M., Velasco, M. V. R., de Carvalho, J. C. M. and Baby, A. R. (2017). Cosmetic attributes of algae - A review. *Algal Research*, *25*, 483–487.
- Arnold, T. M. and Targett, N. M. (2002). Marine tannins: the importance of a mechanistic framework for predicting ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*, *28*, 1919-1934.
- Arzel, P. (1987) Les goémoniers, Le Chasse-Marée. Editions de l'éstran.
- Athukorala, Y., Kim, K.-N. and Jeon, Y.-J. (2006). Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. *Food and Chemical Toxicology*, *44*, 1065-1074.
- Atkinson, M. A. and Eisenbarth, G. S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *The Lancet*, *358*, 221-229.
- Audibert, L., Fauchon, M., Blanc, N., Hauchard, D. and Ar Gall, E. (2010). Phenolic compounds in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: Distribution and radical-scavenging activities. *Phytochemical Analysis*, *21*, 399-405.
- Awad, N. E. (2004). Bioactive brominated diterpenes from the marine red alga *Jania rubens* (L.) Lamx. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *18*, 275-279.
- Azmi, N., Hashim, P., Hashim, D. M., Halimoon, N. and Majid, N. M. N. (2014). Anti-elastase, anti-tyrosinase and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity of earthworm extracts as potential new anti-aging agent. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *4*, S348-S352.

B

- Balay, L., Dargnies, A. and Femenias, A. (2012). Expertise du projet de filière d'algoculture alimentaire en Bretagne. 1-92.
- Balboa, E. M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E. and Domínguez, H. (2013). *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry*, *138*, 1764-1785.

- Balboa, E. M., Soto, M. L., Nogueira, D. R., González-López, N., Conde, E., Moure, A., Vinardell, M. P., Mitijans, M. and Domínguez, H. (2014). Potential of antioxidant extracts produced by aqueous processing of renewable resources for the formulation of cosmetics. *Industrial Crops and Products*, 58, 104-110.
- Balboa, E., Conde, E., Constenla, A., Falqué-López, E. and Domínguez, H. (2017). Sensory evaluation and oxidative stability of a sunscreen formulated with thermal spring waters from Ourense (NW Spain) and *Sargassum muticum* extracts. *Cosmetics*, 4, 19.
- Barbosa, M., Lopes, G., Ferreres, F., Andrade, P. B., Pereira, D. M., Gil-Izquierdo, Á. and Valentão, P. (2017). Phlorotannin extracts from Fucales: Marine polyphenols as bioregulators engaged in inflammation-related mediators and enzymes. *Algal Research*, 28, 1-8.
- Barbosa, M., Lopes, G., Valentão, P., Ferreres, F., Gil-Izquierdo, Á., Pereira, D. M. and Andrade, P. B. (2018). Edible seaweeds' phlorotannins in allergy: A natural multi-target approach. *Food Chemistry*, 265, 233-241.
- Barrero, A. F., Alvarez-Manzaneda, E. J., Herrador, M. M., Chahboun, R. and Galera, P. (1999). Synthesis and antitumoral activities of marine ent-chromazonarol and related compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 9, 2325-2328.
- Barreto, M. and Meyer, J. J. M. (2006). Isolation and antimicrobial activity of a lanosol derivative from *Osmundaria serrata* (Rhodophyta) and a visual exploration of its biofilm covering. *South African Journal of Botany*, 72, 521-528.
- Barwell, C. J., Canham, C. A. and Guiry, M. D. (1989). Hordenine content of the marine alga *Mastocarpus stellatus* and the algal food product carrageen. *Phytotherapy Research*, 3, 67-69.
- Baurain, D., Brinkmann, H., Petersen, J., Rodríguez-Ezpeleta, N., Stechmann, A., Demoulin, V., Roger, A. J., Burger, G., Lang, B. F. and Philippe H. (2010). Phylogenomic evidence for separate acquisition of plastids in Cryptophytes, Haptophytes, and Stramenopiles. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 1698-1709.
- Baweja, P., Kumar, S., Sahoo, D. and Levine, I. (2016). Biology of seaweeds. In J. Fleurence and I. Levine (Eds) *Seaweed in Health and Disease Prevention* (pp. 41-106). Academic Press.
- Bedoux, G., Hardouin, K., Burlot, A. S. and Bourgougnon, N. (2014). Sea plants: bioactive components from seaweeds; cosmetic applications and future development. In N. Bourgougnon (Ed) *Advances in Botanical Research; Sea plants* (pp. 1-561).
- Belda, M., Sanchez, D., Bover, E., Prieto, B., Padrón, C., Cejalvo, D. and Lloris, J. M. (2016). Extraction of polyphenols in *Himantalia elongata* and determination by high performance liquid chromatography with diode array detector prior to its potential use against oxidative stress. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1033-1034, 334-341.
- Bennamara, A., Abourriche, A., Berrada, M., Charrouf, M., Chaib, N., Boudouma, M. and Garneau, F. X. (1999). Methoxybifurcarenone: An antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Phytochemistry*, 52, 37-40.
- Berthon, J. Y., Nachat-Kappes, R., Bey, M., Cadoret, J. P., Renimel, I. and Filaire, E. (2017). Marine algae as attractive source to skin care. *Free Radical Research*, 51, 555-567.
- Birringer, M., Siems, K., Maxones, A., Frank, J., and Lorkowski, S. (2018). Natural 6-hydroxy-chromanols and -chromenols: structural diversity, biosynthetic pathways and health implications. *RSC Advances*, 8, 4803-4841.
- Blackman, A. J. and Matthews, D. J. (1982). Halogenated phloroglucinols from *Rhabdonia verticillata*. *Phytochemistry*, 21, 2141-2142.
- Blanc, N., Hauchard, D., Audibert, L. and Ar Gall, E. (2011). Radical-scavenging capacity of phenol fractions in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: An electrochemical approach. *Talanta*, 84, 513-518.
- Blunden, G. (1993). Marine algae as sources of biologically active compounds. *Interdisciplinary Science Reviews*, 18, 73-80.

- Blunden, G., Jenkins, T. and Liu, Y. W. (1996). Enhanced leaf chlorophyll levels in plants treated with seaweed extract. *Journal of Applied Phycology*, 8, 535–543.
- Borrás Linares, I., Arráez-Román, D., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time. *Journal of Chromatography A*, 1218, 7682–7690.
- Boudouresque, C.-F. (2014) Taxonomy and phylogeny of unicellular Eukaryotes. In J.-C. Bertrand et al. (Eds) *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications: Microbial Ecology* (pp 191-257) Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Bouissou, H., Pieraggi, M. -T, Julian, M. and Savait, T. (1988). The elastic tissue of the skin: A Comparison of spontaneous and actinic (solar) aging. *International Journal of Dermatology*, 27, 327–335.
- Boujaber, N., Oumaskour, K., Lakhdar, F., Assobhei, O. and Etahiri, S. (2017). Potential targets for anti-inflammatory and anticancer activities of marine algae *Gelidium sesquipedale* and *Laminaria ochroleuca*. *International Journal of Advanced Research*, 5, 2320–5407.
- Boulho, R. (2017) Application de procédés éco-responsables pour l'extraction de molécules de la macroalgue *Solieria chordalis*, caractérisations chimiques et étude d'activités biologiques. Thèse, Université de Bretagne Sud, France.
- Bourgougnon, N. and Stiger-Pouvreau, V. (2011). Chemodiversity and bioactivity within red and brown macroalgae along the french coasts, metropole and overseas départements and territories. In S-K. Kim (Ed) *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology* (pp. 58-105). John Wiley Publication.
- Bousquet, J., Khaltaev, N., Cruz, A. A., Denburg, J., Fokkens, W. J., Togias, A., Zuberbier, T., Baena-Cagnani, C. E., Canonica, G. W., Van Weel, C., Agache, I., Aït-Khaled, N., Bachert, C., Blaiss, M. S., Bonini, S., Boulet, L.-P., Bousquet, P.-J., Camargos, P., Carlsen, K.-H., Chen, Y., Custovic, A., Dahl, R., Demoly, P., Douagui, H., Durham, S. R., Gerth Van Wijk, R., Kalayci, O., Kaliner, M. A., Kim, Y.-Y., Kowalski, M. L., Kuna, P., Le, L. T. T., Lemiere, C., Li, J., Lockey, R. F., Mavale-Manuel, S., Meltzer, E. O., Mohammad, Y., Mullol, J., Naclerio, R., O'Hehir, R. E., Ohta, K., Ouedraogo, S., Palkonen, S., Papadopoulos, N., Passalacqua, G., Pawankar, R., Popov, T. A., Rabe, K. F., Rosado-Pinto J., Scadding, G. K., Simons, F. E. R., Toskala, E., Valovirta, E., Van Cauwenberge, P., Wang, D.-Y., Wickman, M., Yawn, B. P., Yorgancioglu, A., Yusuf, O. M., Zar, H., Annesi-Maesano, I., Bateman, E. D., Ben Kheder, A., Boakye, D. A., Bouchard, J., Burney, P., Busse, W. W., Chan-Yeung, M., Chavannes, N. H., Chuchalin, A., Dolen, W. K., Emuzyte, R., Grouse, L., Humbert, M., Jackson, C., Johnston, S. L., Keith, P. K., Kemp, J. P., Klossek, J.-M., Larenas-Linnemann, D., Lipworth, B., Malo, J.-L., Marshall, G. D., Naspitz, C., Nekam, K., Niggemann, B., Nizankowska-Mogilnicka, E., Okamoto, Y., Orru, M. P., Potter, P., Price, D., Stoloff, S. W., Vandenplas, O., Viegi, G. and Williams, D. (2008). Allergic rhinitis and its impact on asthma. *Allergy*, 63, 8-160.
- Brandt, F. S., Cazzaniga, A. and Hann, M. (2011). Cosmeceuticals: current trends and market analysis. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 30, 141-143.
- Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J. and Ponten, J. (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 10124-10128.
- Breton, F., Cérantola, S. and Ar Gall, E. (2011). Distribution and radical scavenging activity of phenols in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 399, 167–172.
- Briand, A., Kornprobst, J. M., Al-Easa, H. S., Rizk, A. F. M. and Toupet, L. (1997). (-)-Paniculatol, a new ent-labdane bromoditerpene from *Laurencia paniculata*. *Tetrahedron Letters*, 38, 3399-3400.
- Brunt, E. G., and Burgess, J. G. (2017). The promise of marine molecules as cosmetic active ingredients. *International Journal of Cosmetic Science*, 40, 1-15.

- Buikema, A. L., McGinniss, M. J. and Cairns, J. (1979). Phenolics in aquatic ecosystems: a selected review of recent literature. *Marine Environmental Research*, 2, 87-181.
- Bunker, F., Brodie, J., Maggs, C., Buker, A. (2017) Seaweeds of Britain and Ireland, 2nd edition. *Wild Nature Press Plymouth*, UK, 5.
- Burel, T., Schaal, G., Grall, J., Le Duff, M., Chapalain, G., Schmitt, B., Gemin, M., Boucher, O. and Ar Gall, E. (2019) Small-scale effects of hydrodynamics on the structure of intertidal macroalgal communities: A novel approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 226.
- Burki, F., Kaplan, M., Tikhonenkov, D. V., Zlatogursky, V., Minh, B. Q., Radaykina, L. V., Smirnov, A., Mylkinov, P. and Keeling P. J. (2016) Untangling the early diversification of Eukaryotes: a phylogenomic study of the evolutionary origins of Centrohelida, Haptophyta and Cytista. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283, 1-10.
- ## C
- Cabioc'h, J., Floc'h, J.-Y., Le Toquin, A., Boudouresque, J.-F., Meinesz, A. and Verlaque, M. (2014) Algues des mers d'Europe. Guide Delachaux. Delachaux et Niestlé.
- Cabrita, M. T., Vale, C. and Rauter, A. P. (2010). Halogenated compounds from marine algae. *Marine Drugs*, 8, 2301-2307.
- 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. and Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 146, 60–78.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., and Ferreira, I. C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13, 377-399.
- Cassan, L., Lamaze, T., Morot-Gaudry, J. F. and Jeannin, I. (1992). The effect of the *Ascophyllum nodosum* extract Goëmar GA 14 on the growth of spinach. *Botanica Marina*, 35, 437–440.
- Cassano, V., De-Paula, J. C., Fujii, M. T., Da Gama, B. A. P. and Teixeira, V. L. (2008). Sesquiterpenes from the introduced red seaweed *Laurencia caduciramulosa* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Biochemical Systematics and Ecology*, 36, 223-226.
- Castro-Puyana, M., Pérez-Sánchez, A., Valdés, A., Ibrahim, O. H. M., Suarez-Álvarez, S., Ferragut, J. A., Micol, V., Cifuentes, A., Ibáñez, E. and García-Cañas, V. (2017). Pressurized liquid extraction of *Neochloris oleoabundans* for the recovery of bioactive carotenoids with anti-proliferative activity against human colon cancer cells. *Food Research International*, 99, 1048–1055.
- Catarino, M. D., Silva, A. M. S. and Cardoso, S. M. (2018). Phycochemical constituents and biological activities of *Fucus* spp. *Marine Drugs*, 16, 249.
- Cattuzzato, L., Dumont, S., Le Gélébart, E. and Loeuil, J. (2018). Obtaining an extract from brown algae gametophytes and use of said extract as a cosmetic anti-aging active principle. Patent FR0028437 A1.
- Cavas, L. and Yurdakoc, K. (2005). A comparative study: assessment of the antioxidant system in the invasive green alga *Caulerpa racemosa* and some macrophytes from the Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 321, 35-41.
- Celikler, S., Tas, S., Vatan, O., Ziyank-Ayvalik, S., Yildiz, G. and Bilaloglu, R. (2009). Anti-hyperglycemic and antigenotoxic potential of *Ulva rigida* ethanolic extract in the experimental diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1837-1840.
- Cérantola, S., Breton, F., Ar Gall, E. and Deslandes, E. (2006). Co-occurrence and antioxidant activities of fucol and fucophlorethol classes of polymeric phenols in *Fucus spiralis*. *Botanica Marina*, 49, 347–351.
- CEVA (2011) Réglementation algues alimentaires. Synthèse CEVA, 1-2.
- Cha, S. H., Lee, K. W. and Jeon, Y. J. (2006). Screening of Extracts from Red Algae in Jeju for Potentials Marine Angiotensin - I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity. *Algae*, 21, 343-348.

- Cha, S. H., Ko, C. I., Kim, D. and Jeon, Y. J. (2012). Protective effects of phlorotannins against ultraviolet B radiation in zebrafish (*Danio rerio*). *Veterinary Dermatology*, *23*, 51-e12.
- Chakraborty, K., Joseph, D. and Praveen, N. K. (2015). Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the Gulf of Mannar of Peninsular India. *Journal of Food Science and Technology*, *52*, 1924-1935.
- Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Wong, L. F., Lianto, F. S., Wong, S. K., Lim, K. K. and Lim, T. Y. (2008). Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*, *109*, 477–483.
- Chan, J. C.-C., Cheung, P. C.-K. and Ang, P. O. (1997). Comparative studies on the effect of three drying methods on the nutritional composition of seaweed *Sargassum hemiphyllum* (Turn.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 3056-3059.
- Chan, Y. Y., Kim, K. H. and Cheah, S. H. (2011). Inhibitory effects of *Sargassum polycystum* on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*, *137*, 1183-1188.
- Chandika, P., Ko, S. and Jung, W. (2015). Marine-derived biological macromolecule-based biomaterials for wound healing and skin tissue regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, *77*, 24–35.
- Charoensiddhi, S., Franco, C., Su, P. and Zhang, W. (2015). Improved antioxidant activities of brown seaweed *Ecklonia radiata* extracts prepared by microwave-assisted enzymatic extraction. *Journal of Applied Phycology*, *27*, 2049-2058.
- Charrier, B., Coelho, S. M., Le Bail, A., Tonon, T., Michel, G., Potin, P., Kloareg, B., Boyen, C., Peters, A. F. and Cock, J. M. (2008). Development and physiology of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: two centuries of research. *New Phytologist*, *177*, 319–332.
- Chemat, F., Vian, M. A. and Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*, 8615-8627.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S. and Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 540–560.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V. and Cravotto, G. (2019). Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*.
- Chen, C. H., Pearson, A. M. and Gray, J. I. (1992). Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chemistry*, *43*, 177-183.
- Chen, Y., Lin, H., Li, Z. and Mou, Q. (2015). The anti-allergic activity of polyphenol extracted from five marine algae. *Journal of Ocean University of China*, *14*, 681-684.
- Chia, S. R., Show, P. L., Phang, S. M., Ling, T. C. and Ong, H. C. (2018). Sustainable approach in phlorotannin recovery from macroalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *126*, 220-225.
- Chlipala, G. E., Tri, P. H., Hung, N. V., Kronic, A., Shim, S. H., Soejarto, D. D. and Orjala, J. (2010). Nhatrangins A and B, alysiatoxin-related metabolites from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula* from Vietnam. *Journal of Natural Products*, *73*, 784-787.
- Cho, M. L., Kang, I. J., Won, M. H., Lee, H. S. and You, S. G. (2010). The antioxidant properties of ethanol extracts and their solvent-partitioned fractions from various green seaweeds. *Journal of Medicinal Food*, *13*, 1232-1239.
- Cho M. L., Lee, H.-S., Kang, I. J., Won, M. H. and You, S. G. (2011). Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. *Food Chemistry*, *127*, 999-1006.
- Cho, T. O. (2016). Composition comprising extract of *Ecklonia cava* or phlorotannin compounds isolated from thereof for preventing or treating influenza. Patent KR20180052258A.

- Choi, H., Engene, N., Smith, J. E., Preskin, L. B. and Gerwick, W. H. (2010). Crossbyanol A–D, toxic brominated polyphenyl ethers from the Hawai'ian bloom-forming cyanobacterium *Leptolyngbya crossbyana*. *Journal of Natural Products*, *73*, 517-522.
- Choi, J., Lee, K., Lee, B., Kim, Y. and Cho, K. K. (2014). Safety, functionality and stability tests of *Ecklonia cava* extract for dermal application. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, *6*, 1-6.
- Choi, J.-S., Moon, W. S., Choi, J. N., Do, K. H., Moon, S. H., Cho, K. K., Han, C.-J. and Choi, I. S. (2013). Effects of seaweed *Laminaria japonica* extracts on skin moisturizing activity in vivo. *Journal of Cosmetic Science*, *64*, 193–205.
- Chowdhury, M. T. H., Bangoura, I., Kang, J. Y., Park, N. G., Ahn, D. H. and Hong, Y. K. (2011). Distribution of phlorotannins in the brown Alga *Ecklonia cava* and comparison of pretreatments for extraction. *Fisheries and Aquatic Sciences*, *14*, 198-204.
- Chowdhury, M., Bangoura, I., Kang, J.-Y., Cho, J. Y., Joo, J., Choi, Y. S., Hwang, D. S. and Hong, Y.-K. (2014). Comparison of *Ecklonia cava*, *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia bicyclis* for phlorotannin extraction. *Journal of Environmental Biology*, *35*, 713–719.
- Ciavatta, M. L., Wahidulla, S., D'Souza, L., Scognamiglio, G. and Cimino, G. (2001). New bromotriterpene polyethers from the Indian alga *Chondria armata*. *Tetrahedron*, *57*, 617-623.
- Cikoš, A. M., Jokić, S., Šubarić, D. and Jerković, I. (2018). Overview on the application of modern methods for the extraction of bioactive compounds from marine macroalgae. *Marine Drugs*, *16*, 348.
- Clarys, P. and Barel, A. (2013). New trends in antiaging cosmetic ingredients and treatments. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*, Third Edition.
- Clayton, M. N. and Ashburner, C. M. (1994). Secretion of phenolic bodies following fertilisation in *Durvillaea potatorum* (Durvillaeales, Phaeophyta). *European Journal of Phycology*, *29*, 1–9.
- Cock, J. M., Peters, A. F. and Coehlo, S. (2011) Brown algae. *Current Biology*, *15*, 573-575.
- Conde, E., Moure, A. and Domínguez, H. (2015). Supercritical CO₂ extraction of fatty acids, phenolics and fucoxanthin from freeze-dried *Sargassum muticum*. *Journal of Applied Phycology*, *27*, 957-964.
- Connan, S. (2004) Etude de la diversité spécifique des macroalgues de la Pointe de Bretagne et analyse des composés phénoliques des Phéophycées dominantes, Thèse, Université de Bretagne Occidentale, France.
- Connan, S., Goulard, F., Stiger, V., Deslandes, E. and Ar Gall, E. (2004). Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Botanica Marina*, *47*, 410-416.
- Connan, S., Delisle, F., Deslandes, E. and Ar Gall, E. (2006). Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Botanica Marina*, *49*, 39–46.
- Connan, S., Deslandes, E. and Ar Gall, E. (2007). Influence of day-night and tidal cycles on phenol content and antioxidant capacity in three temperate intertidal brown seaweeds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *349*, 359–369.
- Córdoba, A., Monjo, M., Hierro-Oliva, M., González-Martín, M. L. and Ramis, J. M. (2015). Bioinspired quercitrin nanocoatings: a fluorescence-based method for their surface quantification, and their effect on stem cell adhesion and differentiation to the osteoblastic lineage. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *7*, 16857-16864.
- Córdoba, A., Satué, M., Gómez-Florit, M., Hierro-Oliva, M., Petzold, C., Lyngstadaas, S. P., González-Martín, M. L., Monjo, M. and Ramis, J. M. (2014). Flavonoid-modified surfaces: multifunctional bioactive biomaterials with osteopromotive, anti-inflammatory, and anti-fibrotic potential. *Advanced Healthcare Materials*, *4*, 540-549.
- Cornish, M. L. and Garbary, D. J. (2010). Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition. *Algae*, *25*, 155-171.
- Corona, G., Ji, Y., Anegboonlap, P., Hotchkiss, S., Gill, C., Yaqoob, P., Spencer, J. P. E. and Rowland, I. (2016). Gastrointestinal modifications and bioavailability of brown seaweed phlorotannins and effects on

- inflammatory markers. *British Journal of Nutrition*, *115*, 1240–1253.
- CosmétiqueMag (2018) Spécial Soins : évolution du marché en France et à l'international, innovations, produits iconiques, Hors série n°15, 1-68. <http://v4.cosmetiquemag.fr/wp-content/uploads/2018/07/HS-Soins-n%C2%B015.pdf>
- CosmeticObs (2018) La cosmétique éco-responsable, le data book 2018. Les éditions de l'observatoire des cosmétiques, 1-95.
- Coşoveanu, A., Axîne, O. and Iacomi, B. (2010). Antifungal activity of macroalgae extracts. *UASVM Bucharest, Series A, LIII*, 442–447.
- Couteau, C., Pommier, M., Papis, E. and Coiffard, L. J. M. (2007). Study of the efficacy of 18 sun filters authorized in European Union tested *in vitro*. *Pharmazie*, *62*, 449–452.
- Couteau, C. and Coiffard, L. (2016). Seaweed application in cosmetics. In J. Fleurence and I. Levine (Eds) *Seaweed in Health and Disease Prevention* (pp. 423-441), Academic Press.
- Couteau, C., Philippe, A., Vibet, M. A., Papis, E. and Coiffard, L. (2018). Study of the influence of substrate and spectrophotometer characteristics on the *in vitro* measurement of sunscreens efficiency. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *121*, 210–217.
- Cox, S., Abu-Ghannam, N. and Gupta, S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *International Food Research Journal*, *17*, 205-220.
- Creis, E., Ar Gall, E. and Potin, P. (2018). Ubiquitous phlorotannins prospects and perspectives. In S. La Barre and S. Bates (Eds) *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules* (pp. 67-117), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Crouch, I. J. and van Staden, J. (1991) Evidence for rooting factors in a seaweed concentrate prepared from *Ecklonia maxima*. *Journal of Plant Physiology*, *136*, 319-322.
- Cruces, E., Atala, E. and Gomez, I. (2016). Comparison of different techniques for the preservation and extraction of phlorotannins in the kelp *Lessonia spicata* (Phaeophyceae): assays of DPPH, ORAC-PGR and ORAC-FL as testing methods. *Journal of Applied Phycology*, *28*, 573–580.
- Culioli, G., Ortalo-Magné, A., Valls, R., Hellio, C., Clare, A. S. and Piovetti, L. (2008). Antifouling activity of meroditerpenoids from the marine brown alga *Halidrys siliquosa*. *Journal of Natural Products*, *71*, 1121-1126.
- Cuong, D. X., Boi, V. N., Van, T. T. T. and Hau, L. N. (2016). Effect of storage time on phlorotannin content and antioxidant activity of six *Sargassum* species from Nhatrang Bay, Vietnam. *Journal of Applied Phycology*, *28*, 567–572.
- Cuong, D. X., Thanh, N. Van and Boi, V. N. (2018). Stability of antioxidant phlorotannin beverage originated from *Sargassum serratum* on the storage time and temperature. *Can Tho University Journal of Science*, *54*, 9–17.

D

- Dang, T. T., Bowyer, M. C., Van Alena, I. A. and Scarlett, C. J. (2018). Optimum conditions of microwave-assisted extraction for phenolic compounds and antioxidant capacity of the brown alga *Sargassum vestitum*. *Separation Science and Technology*, *53*, 1711-1723.
- Da Silva, M. F., Casazza, A. A., Ferrari, P. F., Aliakbarian, B., Converti, A., Bezerra, R. P., Porto, A. L. F. and Perego, P. (2017). Recovery of phenolic compounds of food concern from *Arthrospira platensis* by green extraction techniques. *Algal Research*, *25*, 391-401.
- Davison, J. R. and Bewley, C. A. (2019). Antimicrobial chrysophaentin analogs identified from laboratory cultures of the marine microalga *Chrysophaeum taylorii*. *Journal of Natural Products*, *82*, 148-153.
- Davyt, D., Fernandez, R., Suescun, L., Mombrú, A. W., Saldaña, J., Domínguez, L., Coll, J., Fujii, M. T. and Manta, E. (2001). New sesquiterpene derivatives from the red alga *Laurencia scoparia*. Isolation, structure determination, and anthelmintic activity. *Journal of Natural Products*, *64*, 1552-1555.

- De Carvalho, L. R., Guimarães, S. M. and Roque, N. F. (2006). Sulfated bromophenols from *Osmundaria obtusiloba* (C. Agardh) R.E. Norris (Rhodophyta, Ceramiales). *Brazilian Journal of Botany*, 29, 453-459.
- De Jesus Raposo, M. F. and De Morais, A. M. M. B. (2015). Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke. *Life sciences*, 125, 32-41.
- Delage, L., Meslet-Cladière, L., Potin, P. and Goultquer, S. (2011). Utilisation de « polyketide synthases » de type III (PKS III) recombinantes d'algues brunes marines. Patent FR 2980801.
- De Nanteuil, G. and Mastagli, P. (1981) A bromophenol in the red alga *Halopitys incurvus*. *Phytochemistry*, 20, 1750-1751.
- Deniaud-Bouët, E., Hardouin, K., Potin, P., Kloareg, B. and Hervé, C. (2017). A review about brown algal cell walls and fucose-containing sulfated polysaccharides: Cell wall context, biomedical properties and key research challenges. *Carbohydrate polymers*, 175, 395-408.
- De Reviere, B. (2002) Biologie et phylogénie des algues, Tome 1. *Belin*
- De Reviere, B. (2003) Biologie et phylogénie des algues, Tome 2. *Belin*
- Derrien-Courtel, S., Le Gal, A., Méléder-Tard, V., Bajjouk, T., Derrien, R. and Guillaumont, B. (2010). Fiche de synthèse d'habitat "Laminaires" REBENT, 1-14.
- Directive n° 2008/1/C du 15/01/2008 consulté sur https://aida.ineris.fr/consultation_document/883.
- Dizerbo, A. H. & Herpé, E. (2007) Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique, îles Anglo-Normandes incluses. Landerneau : Anaximandre.
- D'Hondt, E., Martin-Juarez, J., Bolado, S., Kasperoviciene, J., Koreiviene, J., Sulcius, S., Elst, K. and Bastiaens, L. (2017). Cell disruption technologies. In C. Gonzalez-Fernandez and R. Muñoz (Eds) *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts* (pp. 133-154), Woodhead Publishing.
- Douglas, T. E. L., Dokupil, A., Reczyńska, K., Brackman, G., Krok-Borkowicz, M., Keppler, J. K., Božič, M., Van Der Voort, P., Pietryga, K., Samal, S. K., Balcaen, L., Van Den Bulcke, J., Van Acker, J., Vanhaecke, F., Schwarz, K., Coenye, T. and Pamuła, E. (2016). Enrichment of enzymatically mineralized gellan gum hydrogels with phlorotannin-rich *Ecklonia cava* extract Seanol® to endow antibacterial properties and promote mineralization. *Biomedical Materials*, 11, 045015.
- Duan, X. J., Zhang, W. W., Li, X. M. and Wang, B. G. (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*, 95, 37-43.

E

- Edgerton, D. S., Kraft, G., Smith, M., Farmer, B., Williams, P. E., Coate, K. C., Printz, R. L., O'Brien, R. M. and Cherrington, A. D. (2017). Insulin's direct hepatic effect explains the inhibition of glucose production caused by insulin secretion. *JCI insight*, 2, e91863.
- Elloulali, M., Boisson-vidal, C., Durand, P. and Jozefonvic, J. (1993). Antitumor-activity of low-molecular-weight fucans extracted from brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Anticancer Research*, 13, 2011-2020.
- Eom, S. H., Kim, Y. M. and Kim, S. K. (2012). Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 3251-3255.
- Eom, S. H., Kim, D. H., Lee, S. H., Yoon, N. Y., Kim, J. H., Kim, T. H., Chung, Y. H., Kim, S. B., Kim, Y. M., Kim, H. W., Lee, M. S. and Kim, Y. M. (2013). *In vitro* antibacterial activity and synergistic antibiotic effects of phlorotannins isolated from *Eisenia bicyclis* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy Research*, 27, 1260-1264.
- Eom, S. H., Moon, S. Y., Lee, D. S., Kim, H. J., Park, K., Lee, E. W., Kim, T. H., Chung, Y. H., Lee, M. S. and Kim, Y. M. (2015). *In vitro* antiviral activity of dieckol and phlorofucofuroeckol-A isolated from edible brown alga *Eisenia bicyclis* against murine norovirus. *Algae*, 30, 241-246.

- Eshun, K. and He, Q. (2004). Aloe vera: a valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*, 91-96.
- Esquivel-Hernández, D. A., Ibarra-Garza, I. P., Rodríguez-Rodríguez, J., Cuéllar-Bermúdez, S. P., Rostro-Alanis, M. de J., Alemán-Nava, G. S., García-Pérez, J. S. and Parra-Saldívar, R. (2017). Green extraction technologies for high-value metabolites from algae: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *11*, 215-231.
- Etahiri, S., Bultel-Poncé, V., Caux, C. and Guyot, M. (2001). New bromoditerpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Journal of Natural Products*, *64*, 1024-1027.
- ## F
- Fallarero, A., Loikkanen, J.J., Mansito, P.T., Castañeda, O. and Vidal, A. (2003). Effects of aqueous extracts of *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux and *Bryothamnion triquetrum* (S.G. Gmelin) Howe on hydrogen peroxide and methyl mercury-induced oxidative stress in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. *Phytomedicine*, *10*, 39-47.
- FAO (2014) La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture – Possibilités et défis. Rome.
- FAO (2018) La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2018 – Atteindre les objectifs de développement durable. Rome. CC BY-NS-SA.
- Farvin, S. K. H. and Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*, *138*, 1670-1681.
- Fayad, S., Nehmé, R., Tannoury, M., Lesellier, E., Pichon, C. and Morin, P. (2017). Macroalga *Padina pavonica* water extracts obtained by pressurized liquid extraction and microwave-assisted extraction inhibit hyaluronidase activity as shown by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, *1497*, 19-27.
- Feng, Y., Carroll, A. R., Addepalli, R., Fechner, G. A., Avery, V. M. and Quinn, R. J. (2007). Vanillic acid derivatives from the green algae *Cladophora socialis* as potent protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. *Journal of Natural Products*, *70*, 1790-1792.
- Fernández-Segovia, I., Lerma-García, M. J., Fuentes, A. and Barat, J. M. (2018). Characterization of Spanish powdered seaweeds: Composition, antioxidant capacity and technological properties. *Food Research International*, *111*, 212–219.
- Ferreres, F., Lopes, G., Gil-Izquierdo, A., Andrade, P. B., Sousa, C., Mougá, T. and Valentão, P. (2012). Phlorotannin extracts from Fucales characterized by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ: Approaches to hyaluronidase inhibitory capacity and antioxidant properties. *Marine Drugs*, *10*, 2766-2781.
- Fisch, K. M., Böhm, V., Wright, A. D. and König, G. M. (2003). Antioxidative meroterpenoids from the brown alga *Cystoseira crinita*. *Journal of Natural Products*, *66*, 968-975.
- Fletcher, R. L. (2011) Seaweeds of the British Isles: Fucophyceae - Phaeophyceae. *Natural History Museum*, 3. Pelagic publishing.
- Flexner, C. (2007). HIV drug development: the next 25 years. *Nature Reviews Drug Discovery*, *6*, 959-966.
- Floc'h, J.-Y. (1964) Les algues marines et leur utilisation. *Penn Ar Bed*, *37*, 188-189.
- Flodin, C., Helidoniotis, F. and Whitfield, F. B. (1999). Seasonal variation in bromophenol content and bromoperoxidase activity in *Ulva lactuca*. *Phytochemistry*, *51*, 135-138.
- Forbes, J. M. and Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews*, *93*, 137-188.
- Ford, L., Theodoridou, K., Sheldrake, G. N. and Walsh, P. J. (2019). A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. *Phytochemical Analysis*, 1-13.
- Freile-Pelegrin, Y. and Robledo, D. (2014). Bioactive phenolic compounds from algae. In B. Hernandez-Ledesma and M. Herrero (Eds) *Bioactive compounds*

from marine foods: Plant and animal sources (pp. 113-129), John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK.

Fritig, B., Heitz, T. and Legrand, M. (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology*, 16–22.

G

Gallego, R., Montero, L., Cifuentes, A., Ibáñez, E. and Herrero, M. (2018). Green extraction of bioactive compounds from microalgae. *Journal of Analysis and Testing*, 2, 1-15.

Garcia-Pichel, F. and Castenholz, R. W. (1991). Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *Journal of Phycology*, 27, 395-409.

Garineaud, C (2017) Récolte de la mer : des savoirs et des pratiques des collecteurs d'algues à la gestion durable des ressources côtières dans le Finistère (Bretagne). Thèse, MNHN Paris, France.

Gayral, P. (1966) Algues des côtes Françaises (Manche et Atlantique). Notions fondamentales sur l'écologie, la biologie et la systématique des algues marines. Editions Doin, Paris.

Geiselman, J. A. and McConnell, O. J. (1981). Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: Chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*. *Journal of Chemical Ecology*, 7, 1115-1133.

Generalić Mekinić I, Skroza D, Šimat V, Hamed, I, Čagalj, M and Popović Perković, Z. (2019) Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification. *Biomolecules*, 9, 1-25.

Gertler, A. and Hofmann, T. (1970). Acetyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine methyl ester : a new highly specific elastase substrate. *Canadian Journal of Biochemistry*, 48, 384–386.

Gil, B., Ferrándiz, M. L., Sanz, M. J., Terencio, M. C., Ubeda, A., Roviroso, J., San-Martin, A., Alcaraz, M. J. and Payá, M. (1995). Inhibition of inflammatory

responses by epitaondiol and other marine natural products. *Life Sciences*, 57, 1–6.

Gilchrest, B. A., Blog, F. B. and Szabo, G. (1979). Effects of aging and chronic sun exposure on melanocytes in human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 73, 141-143.

Ginnaga, A., Hirayama, I., Iwamura, Y., Nagayama, K., Nakamura, T. and Kiminori, N. (2002). Antibacterial agent based on phlorotannins. Patent JP2003277203.

Girish, K. S. and Kemparaju, K. (2007). The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences*, 80, 1921-1943.

Glombitza, K. W. and Grosse-Damhues, J. (1984). Phlorotannins of the brown alga *Himanthalia elongata*. *Antibiotics from Algae*, 24, 42–46.

Glombitza, K. W., & Rösener, H.-U. (1974). Bifuhalol : ein diphenylather *Bifurcaria bifurcata*. 13, 1245–1247.

Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., De Paepe, D., Baart, G. J. E. and De Cooman, L. (2014) Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *Journal of Phycology*, 50, 483-492.

Gómez-Guzmán, M., Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F. and Gálvez, J. (2018). Potential role of seaweed polyphenols in cardiovascular-associated disorders. *Marine Drugs*, 16, 1-21.

Gorham J. and Lewey S.A. (1984). Seasonal changes in the chemical composition of *Sargassum muticum*. *Marine Biology*, 80, 103–107.

Gonçalves-Fernández, C., Sineiro, J., Moreira, R. and Gualillo, O. (2019). Extraction and characterization of phlorotannin-enriched fractions from the Atlantic seaweed *Bifurcaria bifurcata* and evaluation of their cytotoxic activity in murine cell line. *Journal of Applied Phycology*. In press.

Gröniger, A. and Häder, D. P. (2002). Induction of the synthesis of an UV-absorbing substance in the green alga *Prasiola stipitata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66, 54-59.

Grulois, D. (2010) Etude de la dispersion et du recrutement à différentes échelles spatiales chez

Undaria pinnatifida, une macro-algue introduite le long des côtes brtonnes. Thèse, Université Pierre et Marie Curie, France.

Guinea, M., Franco, V., Araujo-Bazán, L., Rodríguez-Martín, I. and González, S. (2012). *In vivo* UVB-photoprotective activity of extracts from commercial marine macroalgae. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3–4), 1109–1117.

Guiry, M. D. (2012). How many species of algae are there? *Journal of Phycology*, 48, 1057–1063.

Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K. and Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*, 33, 243–260.

Gupta, S. and Abu-Ghannam, N. (2011a). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science and Technology*, 22, 315–326.

Gupta, S. and Abu-Ghannam, N. (2011b). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 600–609.

Güven, K.C., Bora, A. and Sunam, G. (1970). Hordenine from the algae *Phyllophora nervosa*. *Phytochemistry*, 9, 1893.

H

Habauzit, V. and Horcajada, M.-N. (2007). Phenolic phytochemicals and bone. *Phytochemistry Reviews*, 7, 313–344.

Han, Y.-S. and Han, T. (2005). UV-B induction of UV-B protection in *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 41, 523–530.

Harada, H. and Kamei, Y. (1998). Dose-dependent selective cytotoxicity of extracts from marine green alga, *Cladophoropsis vaucheriaeformis*, against mouse leukemia L1201 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21, 386–389.

Harborne, J. B. (1984). Phenolic Compounds. In J. B. Harborne (Ed) *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* (pp. 37–99), Springer Netherlands.

Hardouin, K., Burlot, A. S., Umami, A., Tanniou, A., Stiger-Pouvreau, V., Widowati, I., Bedoux, G. and Bourgougnon, N. (2014). Biochemical and antiviral activities of enzymatic hydrolysates from different invasive French seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 26, 1029–1042.

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

Hartley, B. S. and Shotton, D. M. (1971) Pancreatic elastase. In P. D. Boyer (Ed) *Hydrolysis: peptide bonds. The enzymes*, 3, (pp 323–373). Elsevier.

He, Z., Chen, Y., Chen, Y., Liu, H., Yuan, G., Fan, Y. and Chen, K. (2013). Optimization of the microwave-assisted extraction of phlorotannins from *Saccharina japonica* Aresh and evaluation of the inhibitory effects of phlorotannin-containing extracts on HepG2 cancer cells. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 31, 1045–1054.

Heavisides, E., Rouger, C., Reichel, A., Ulrich, C., Wenzel-Storjohann, A., Sebens, S. and Tasdemir D. (2018). Seasonal variations in the metabolome and bioactivity profile of *Fucus vesiculosus* extracted by an optimised, pressurised liquid extraction protocol. *Marine Drugs*, 16, 503.

Heesch, S., Serrano-Serrano, M., Luthringer R., Peters, A. F., Destombes, C., Cock, M., Vlaero, M., Roze, D., Salamin, N. and Coelho, S. (2019) Evolution of life cycles and reproductive traits: insights from the brown algae. *BioRxiv*.

Heffernan, N., Smyth, T. J., Fitzgerald, R. J., Soler-Vila, A. and Brunton, N. (2014). Antioxidant activity and phenolic content of pressurised liquid and solid-liquid extracts from four Irish origin macroalgae. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 1765–1772.

- Heffernan, N., Smyth, T. J., Soler-Villa, A., Fitzgerald, R. J. and Brunton, N. P. (2015a). Phenolic content and antioxidant activity of fractions obtained from selected Irish macroalgae species (*Laminaria digitata*, *Fucus serratus*, *Gracilaria gracilis* and *Codium fragile*). *Journal of Applied Phycology*, *27*, 519–530.
- Heffernan, N., Brunton, N. P., FitzGerald, R. J. and Smyth, T. J. (2015b). Profiling of the molecular weight and structural isomer abundance of macroalgae-derived phlorotannins. *Marine Drugs*, *13*, 509–528.
- Hellio, C., Marechal, J. P., Véron, B., Bremer, G., Clare, A. S. and Le Gal, Y. (2004). Seasonal variation of antifouling activities of marine algae from the Brittany Coast (France). *Marine Biotechnology*, *6*, 67–82.
- Henry, B. E. and Van Alstyne, K. L. (2004). Effects of UV radiation on growth and phlorotannins in *Fucus gardneri* (Phaeophyceae) juveniles and embryos. *Journal of Phycology*, *40*, 527–533.
- Heo, S. J. and Jeon, Y. J. (2009). Evaluation of diphenol hydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae* for radical scavenging activity and its protective effect against H₂O₂-induced cell damage. *Process Biochemistry*, *44*, 412–418.
- Heo, S. J., Ko, S. C., Cha, S. H., Kang, D. H., Park, H. S., Choi, Y. U., Kim, D., Jung, W. K. and Jeon, Y. J. (2009). Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. *Toxicology in Vitro*, *23*, 1123–1130.
- Hermund, D. B., Plaza, M., Turner, C., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H. G., Jacobsen, C. and Nielsen, K. F. (2018). Structure dependent antioxidant capacity of phlorotannins from Icelandic *Fucus vesiculosus* by UHPLC-DAD-ECD-QTOFMS. *Food Chemistry*, *240*, 904–909.
- Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergård, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., McCloskey, E. V., Jönsson, B. and Kanis, J. A. (2013). Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. *Archives of Osteoporosis*, *8*, 1–2.
- Herrero, M. (2010). Green processes for extraction of bioactives from Rosemary. Chemical and functional characterization via UPLC-MS/MS and in-vitro assays. *Journal of Chromatography A*, *16*, 2512–2520.
- Horta, A., Pinteus, S., Alves, C., Fino, N., Silva, J., Fernandez, S., Rodrigues, A. and Pedrosa, R. (2014). Antioxidant and antimicrobial potential of the *Bifurcaria bifurcata* epiphytic bacteria. *Marine Drugs*, *12*, 1676–1689.
- Huang, D. and Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 1841–1856.
- Humbert, L. (2010). Revue générale : Extraction en phase solide (SPE), théorie et applications, *Annales de Toxicologie Analytique*, *22*, 61–68.
- Hunter, P. M. and Hegele, R. A. (2017). Functional foods and dietary supplements for the management of dyslipidaemia. *Nature Reviews Endocrinology*, *13*, 278.
- Hwang, H., Chen, T., Nines, R. G., Shin, H. C. and Stoner, G. D. (2006). Photochemoprevention of UVB- induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by brown algae polyphenols. *International Journal of Cancer*, *119*, 2742–2749.
- Hwang, P.-A., Hung, Y.-L., Tsai, Y.-K., Chien, S.-Y. and Kong, Z.-L. (2015). The brown seaweed *Sargassum hemiphyllum* exhibits α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity and enhances insulin release *in vitro*. *Cytotechnology*, *67*, 653–660.
- Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J. and Castro-Puyana, M. (2012). Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. In M. Hayes (Ed) *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications* (pp. 55–98), Springer.
- Idealg (2015). Les chiffres clés, consulté sur <https://idealg.u-bretagne-normandie.fr/fr/les-chiffres-cles>
- Imbs, T. I. and Zvyagintseva, T. N. (2018). Phlorotannins are Polyphenolic Metabolites of Brown Algae. *Russian Journal of Marine Biology*, *44*, 263–273.

Imokawa, G., Takema, Y., Yorimoto, Y., Tsukahara, K., Kawai, M. and Imayama, S. (1995). Degree of ultraviolet-induced tortuosity of elastic fibers in rat skin is age dependent. *Journal of Investigative Dermatology*, 105, 254–258.

Ishii, T., Okino, T., Suzuki, M. and Machiguchi, Y. (2004). Tichocarpols A and B, two novel phenylpropanoids with feeding-deterrent activity from the red alga *Tichocarpus crinitus*. *Journal of Natural Products*, 67, 1764-1766.

J

James, P. T., Leach, R., Kalamara, E. and Shayeghi, M. (2012). The worldwide obesity epidemic. *Obesity Research*, 9, 228S-233S.

Jaswir, I., Tope, T., Raus, R., Monsur, A. and Ramli, N. (2014). Study on anti-bacterial potentials of some Malaysian brown seaweeds, *Food Hydrocolloids*, 42, 275-279.

Jdey, A. (2017) Capacité photoprotectrice et anti-âge de quelques plantes halophytes du littoral Breton et de Tunisie. Thèse, Université de Bretagne Occidentale, France.

Je, J., Park, P., Kim, E., Park, J., Yoon, H., Kim, K. and Ahn, C. (2009). LWT - Food Science and Technology Antioxidant activity of enzymatic extracts from the brown seaweed *Undaria pinnatifida* by electron spin resonance spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 874–878.

Jégou C. (2011) Etude du genre *Cystoseira* des côtes bretonnes : taxinomie, écologie et caractérisation de substances naturelles. Thèse, Université de Bretagne Occidentale, France.

Jégou, C., Culioli, G. and Stiger-Pouvreau, V. (2012). Meroditerpene from *Cystoseira nodicaulis* and its taxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 44, 202-204.

Jégou, C., Kervarec, N., Cérantola, S., Bihannic, I. and Stiger-Pouvreau, V. (2015) NMR use to quantify phlorotannins. The case of *Cystoseira tamariscifolia*, a

phloroglucinol-producing brown macroalga in Brittany (France). *Talanta*, 135, 1-6.

Jennings, J. G. and Steinberg, P. D. (1997). Phlorotannins versus other factors affecting epiphyte abundance on the kelp *Ecklonia radiata*. *Oecologia*, 109, 461-473.

Jiménez, J. T., O'Connell, S., Lyons, H., Bradley, B. and Hall, M. (2010). Antioxidant, antimicrobial, and tyrosinase inhibition activities of acetone extract of *Ascophyllum nodosum*. *Chemical Papers*, 64, 434-442.

Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Pulido, R. and Saura-Calixto, F. (2001). Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 81, 530-534.

Joe, M. J., Kim, S. N., Choi, H. Y., Shin, W. S., Park, G. M., Kang, D. W. and Kim, Y. K. (2006). The inhibitory effects of eckol and dieckol from *Ecklonia stolonifera* on the expression of matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29, 1735-1739.

Johnell, O. and Kanis, J. A. (2006). An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporosis International*, 17, 1726-1733.

Joy, B. and Kuruvilla, M. (2017). Screening of *Turbinaria* for the presence and stability of antimicrobial compounds. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 4, 400–408.

Jung, H. A., Hyun, S. K., Kim, H. R. and Choi, J. S. (2006). Angiotensin-converting enzyme I inhibitory activity of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fisheries Science*, 72, 1292-1299.

Jung, W. K., Choi, I., Oh, S., Park, S. G., Seo, S. K., Lee, S. W., Lee, D. S., Heo, S. J., Jeon, Y. J., Je, J. Y., Ahn, C. B., Kim, J. S., Oh, K. S., Kim, Y. M., Moon, C. and Choi, I. W. (2009). Anti-asthmatic effect of marine red alga (*Laurencia undulata*) polyphenolic extracts in a murine model of asthma. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 293-297.

K

- Kadam, S. U., Álvarez, C., Tiwari, B. K. and O'Donnell, C. P. (2015a). Extraction of biomolecules from seaweeds. In B. K. Tiwari and D. J. Troy (Eds) *Seaweed Sustainability* (pp. 243-269), Academic Press.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Smyth, T. J. and O'Donnell, C. P. (2015b). Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, *23*, 308-316.
- Kahn, S. E., Cooper, M. E. and Del Prato, S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *The Lancet*, *383*, 1068-1083.
- Kamiya, M., Nishio, T., Yokoyama, A., Yatsuya, K., Nishigaki, T., Yoshikawa, S. and Ohki, K. (2010). Seasonal variation of phlorotannin in Sargassacean species from the coast of the Sea of Japan. *Phycological Research*, *58*, 53-61.
- Kang, C.H., Choi, Y.H., Park, S.Y. and Kim, G.Y. (2012b). Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Codium fragile* in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Journal of Medicinal Food*, *15*, 44-50.
- Kang, H. S., Kim, H. R., Byun, D., Son, B. W., Nam, T. J. and Choi, J. S. (2004). Tyrosinase inhibitors isolated from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Marine Science and Technology Bulletin*, *14*, 49-56.
- Kang, K. A., Lee, K. H., Chae, S., Zhang, R., Jung, M. S., Lee, Y., Kim, S. Y., Kim, H. S., Joo, H. G., Park, J. W., Ham, Y. M., Lee, N. H. and Hyun, J. W. (2005). Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. *FEBS Letters*, *579*, 6295-6304.
- Kang, S. M., Cha, S. H., Ko, J. Y., Kang, M. C., Kim, D., Heo, S. J., Kim, J. S., Heu, M.S. S., Kim, Y. T., Jung, W. K. and Jeon, Y. J. (2012a). Neuroprotective effects of phlorotannins isolated from a brown alga, *Ecklonia cava*, against H₂O₂-induced oxidative stress in murine hippocampal HT22 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *34*, 96-105.
- Karadeniz, F., Kang, K. H., Park, J. W., Park, S. J. and Kim, S. K. (2014a). Anti-HIV-1 activity of phlorotannin derivative 8,4''-dieckol from Korean brown alga *Ecklonia cava*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *78*, 1151-1158.
- Karadeniz, F., Ahn, B.-N., Kim, J.-A., Seo, Y., Jang, M.-S., Nam, K.-H., Kim, M., Lee, S.-H. and Kong, C.-S. (2015b). Phlorotannins suppress adipogenesis in pre-adipocytes while enhancing osteoblastogenesis in pre-osteoblasts. *Archives of Pharmacal Research*, *38*, 2172-2182.
- Karadeniz, F., Karagozlu, M. Z., and Kim, S. K. (2015a). Antiviral activities of marine algal extracts. In S-K. Kim and K. Chojnacka (Eds) *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications* (pp. 371-380), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Karadeniz, F., Kim, J.-A., Ahn, B.-N., Kwon, M. and Kong, C.-S. (2014b). Effect of *Salicornia herbacea* on Osteoblastogenesis and Adipogenesis *in Vitro*. *Marine Drugs*, *12*, 5132-5147.
- Karsten, U., Wulff, A., Roleda, M. Y., Müller, R., Steinhoff, F. S., Fredersdorf, J. and Wiencke, C. (2009). Physiological responses of polar benthic algae to ultraviolet radiation. *Botanica Marina*, *52*, 639-654.
- Karthik, R., Manigandan, V., Sheeba, R., Saravanan, R. and Rajesh, P. R. (2016). Structural characterization and comparative biomedical properties of phloroglucinol from Indian brown seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, *28*, 3561-3573.
- Kazłowska, K., Hsu, T., Hou, C. C., Yang, W. C. and Tsai, G. J. (2010). Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentata*. *Journal of Ethnopharmacology*, *128*, 123-130.
- Kepekçi, R. A. and Saygideger, S. D. (2012). Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation. *Journal of Applied Phycology*, *24*, 897-905.
- Khan, M. N. A., Choi, J. S., Lee, M. C., Kim, E., Nam, T. J., Fujii, H. and Hong, Y. K. (2008). Anti-inflammatory activities of methanol extracts from various seaweed species. *Journal of Environmental Biology*, *29*, 465-469.
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Craigie, J. S., Norrie, J. and Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and

- development. *Journal of Plant Growth Regulation*, *28*, 386–399.
- Kim, A.-R., Shin, T.-S., Lee, M.-S., Park, J.-Y., Park, K.-E., Yoon, N.-Y., Kim, J.-S., Choi, J.S., Jang, B.-C., Byun, D.-S., Park, N.-K. and Kim, H.-R. (2009). Isolation and identification of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera* with antioxidant and anti-inflammatory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 3483–3489.
- Kim, E. B. and Kwak, J. H. (2015) Antiviral phlorotannin from *Eisenia bicyclis* against human papilloma virus *in vitro*. *Planta Medica*, *81*, PW_22.
- Kim, H.-H., Kim, H.-S., Ko, J.-Y., Kim, C.-Y., Lee, J.-H. and Jeon, Y.-J. (2016) A single-step isolation of useful antioxidant compounds from *Ishige okamurae* by using centrifugal partition chromatography. *Fisheries and Aquatic Sciences*, *19*, 1-7.
- Kim, H. J., Dasagrandhi, C., Kim, S. H., Kim, B. G., Eom, S. H. and Kim, Y. M. (2018). *In Vitro* antibacterial activity of phlorotannins from edible brown algae, *Eisenia bicyclis* against streptomycin-resistant *Listeria monocytogenes*. *Indian Journal of Microbiology*, *58*, 105-108.
- Kim, H. R. (2011) Ethanol fraction, ethyl acetate fraction, and phlorotannins separated from *Ecklonia stolonifera* or *E. cava* for the hepatoprotection on alcoholic hepatic damage and use thereof as hepatoprotection? Patent KR101301190 B1.
- Kim, K. Y., Nguyen, T. H., Kurihara, H. and Kim, S. M. (2010). α -Glucosidase inhibitory activity of bromophenol purified from the red alga *Polyopes lancifolia*. *Journal of Food Science*, *75*, H145-H150.
- Kim, M. M., Van Ta, Q., Mendis, E., Rajapakse, N., Jung, W. K., Byun, H. G., Jeon, Y. J. and Kim, S. K. (2006). Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity. *Life Sciences*, *79*, 1436-1443.
- Kim S. K., Kim, Y. M., Lee M. S. and Eom, S. H. (2012) Antibiotic composition including phlorotannin compound derived from *Eisenia bicyclis* as effective component. Patent US20130338217 A1.
- Kirke, D. A., Smyth, T. J., Rai, D. K., Kenny, O. and Stengel, D. B. (2017). The chemical and antioxidant stability of isolated low molecular weight phlorotannins. *Food Chemistry*, *221*, 1104-1112.
- Kladi, M., Vagias, C., Papazafiri, P., Furnari, G., Serio, D. and Roussis, V. (2007). New sesquiterpenes from the red alga *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron*, *63*, 7606-7611.
- Klejdus, B., Lojková, L., Plaza, M., Šnóblová, M. and Štěrbová, D. (2010). Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1217*, 7956-7965.
- Klejdus, B., Kopecký, J., Benešová, L. and Vacek, J. (2009). Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *Journal of Chromatography A*, *1216*, 763-771.
- Ko, S. C., Cha, S. H., Heo, S. J., Lee, S. H., Kang, S. M. and Jeon, Y. J. (2011). Protective effect of *Ecklonia cava* on UVB-induced oxidative stress: *In vitro* and *in vivo* zebrafish model. *Journal of Applied Phycology*, *23*, 697-708.
- Koch, M., Glombitza, K. W. and Eckhard, G. (1980). Phlorotannins of Phaeophyceae *Laminaria ochroleuca*. *Phytochemistry*, *19*, 1821–1823.
- Koch, M., Glombitza, K. W. and Rösener, H. U. (1981). Polyhydroxyphenyl ethers from *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry*, *20*, 1373–1379.
- Kok, J. M. L., Jee, J. M., Chew, L. Y. and Wong, C. L. (2016). The potential of the brown seaweed *Sargassum polycystum* against acne vulgaris. *Journal of Applied Phycology*, *28*, 3127-3133.
- Koivikko, R., Loponen, J., Honkanen, T. and Jormalainen, V. (2005). Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *Journal of Chemical Ecology*, *31*, 195-212.
- Kong, C.-S., Kim, J.-A., Yoon, N.-Y. and Kim, S.-K. (2009). Induction of apoptosis by phloroglucinol derivative

- from *Ecklonia cava* in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, *47*, 1653-1658.
- Koonin, E. V. and Starokadomskyy, P. (2016). Are viruses alive? The replicator paradigm sheds decisive light on an old but misguided question. *Studies in history and philosophy of science part C: Studies in history and philosophy of biological and biomedical sciences*, *59*, 125-134.
- Körner, A. and Pawelek, J. (1982). Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science*, *217*, 1163-1165.
- Kornprobst, J. M. (2005) Substances naturelles d'origine marine. Lavoisier SAS.
- Kornprobst, J. M. (2014). Encyclopedia of marine natural products (2nd ed.). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Kronholm, J., Hartonen, K. and Riekkola, M. L. (2007). Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *26*, 396-412
- Kubanek, J., Prusak, A. C., Snell, T. W., Giese, R. A., Fairchild, C. R., Aalbersberg, W. and Hay, M. E. (2006). Bromophycolides C-I from the Fijian Red Alga *Callophycus serratus*. *Journal of Natural Products*, *69*, 731-735.
- Kuda, T. and Ikemori, T. (2009). Minerals, polysaccharides and antioxidant properties of aqueous solutions obtained from macroalgal beach-casts in the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan. *Food Chemistry*, *112*, 575-581.
- Kurihara, H., Konno, R., and Takahashi, K. (2015). Fucophlorethol C, a phlorotannin as a lipoxigenase inhibitor. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *79*, 1954-1956.
- Kurth, C., Welling, M. and Pohnert, G. (2015). Sulfated phenolic acids from Dasycladales siphonous green algae. *Phytochemistry*, *117*, 417-423.
- La Barre, S., Potin, P., Leblanc, C. and Delage, L. (2010). The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. *Marine Drugs*, *8*, 988-1010.
- Laine-Penel, A., Mayen, P. and Spinec, F. (2016). L'algoculture : étude sur le métier, les savoirs, les compétences et la formation. AGROCAMPUS OUEST.
- Laizé, V., Gavaia, P.J. and Cancela, M.L. (2014). Fish: a suitable system to model human bone disorders and discover drugs with osteogenic or osteotoxic activities. *Drug Discovery Today*, *13*, 29-37.
- Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H. and Finkel, P. (2006). Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International Journal of Cosmetic Science*, *28*, 359-370.
- Lambrecht, B. N. and Hammad, H. (2015). The immunology of asthma. *Nature Immunology*, *16*, 45-56.
- Lamela, M., Anca, J., Villar, R., Otero, J. and Calleja, J. M. (1989). The hypoglycemic activity of several seaweed extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, *27*, 35-43.
- Lamy, F. and Tauber, S. (1963). Studies on elastase and elastin. *The Journal of Biological Chemistry*, *238*, 939-944.
- Lane, A. L., Stout, E. P., Lin, A. S., Prudhomme, J., Le Roch, K., Fairchild, C. R., Franzblau, S. G., Hay, M. E., Aalbersberg, W. and Kubanek, J. (2009). Antimalarial bromophycolides J-Q from the Fijian red alga *Callophycus serratus*. *The Journal of Organic Chemistry*, *74*, 2736-2742.
- Larsen, J. N., Broge, L. and Jacobi, H. (2016). Allergy immunotherapy: The future of allergy treatment. *Drug Discovery Today*, *21*, 26-37.
- Laurens, L. M. L. and Wolfrum, E. J. (2011). Feasibility of spectroscopic characterization of algal lipids: Chemometric correlation of NIR and FTIR Spectra with exogenous lipids in algal biomass. *Bioenergy Research*, *4*, 22-35.

L

- Lauritano, C. and Ianora, A. (2016). Marine organisms with anti-diabetes properties. *Marine Drugs*, *14*, 220-234.
- Le, Q. T., Li, Y., Qian, Z. J., Kim, M. M. and Kim, S. K. (2009). Inhibitory effects of polyphenols isolated from marine alga *Ecklonia cava* on histamine release. *Process Biochemistry*, *44*, 168-176.
- Leal, D., Matsuhiro, B., Rossi, M. and Caruso, F. (2008). FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydrate Research*, *343*, 308–316.
- Lee, J. B., Hayashi, K., Hashimoto, M., Nakano, T. and Hayashi, T. (2004). Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *52*, 1091–1094.
- Lee, J. H., Eom, S. H., Lee, E. H., Jung, Y. J., Kim, H. J., Jo, M. R., Son, K. T., Lee, H. J., Kim, J. H., Lee, M. S. and Kim, Y. M. (2014a). *In vitro* antibacterial and synergistic effect of phlorotannins isolated from edible brown seaweed *Eisenia bicyclis* against acne-related bacteria. *Algae*, *29*, 47-55.
- Lee, J. H., Ko, J. Y., Oh, J. Y., Kim, C. Y., Lee, H. J., Kim, J. and Jeon, Y. J. (2014b). Preparative isolation and purification of phlorotannins from *Ecklonia cava* using centrifugal partition chromatography by one-step. *Food Chemistry*, *158*, 433–437.
- Lee, J.-H., Ko, J.-Y., Oh, J.-Y., Kim, E.-A., Kim, C.-Y. and Jeon, Y.-J. (2015). Evaluation of phlorofucofuroeckol-A isolated from *Ecklonia cava* (Phaeophyta) on anti-lipid peroxidation *in vitro* and *in vivo*. *Algae*, *30*, 313-323.
- Lee, R. E. (1999). *Phycology* (3rd ed.). Cambridge University Press.
- Lee, S.-H., Kang, M.-C., Moon, S.-H., Jeon, B.-T. and Jeon, Y.-J. (2013). Potential use of ultrasound in antioxidant extraction from *Ecklonia cava*. *Algae*, *28*, 371-378.
- Lee, S.-H., Park, M.-H., Heo, S.-J., Kang, S.-M., Ko, S.-C., Han, J.-S. and Jeon, Y.-J. (2010). Dieckol isolated from *Ecklonia cava* inhibits α -glucosidase and α -amylase *in vitro* and alleviates postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food and Chemical Toxicology*, *48*, 2633-2637.
- Le Guillard, C., Bergé, J. P., Donnay-Moreno, C., Bruzac, S., Ragon, J. Y., Baron, R., Fleurence, J. and Dumay, J. (2016). Soft liquefaction of the red seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis process. *Journal of Applied Phycology*, *28*, 2575–2585.
- Le Lann, K., Jégou, C. and Stiger-Pouvreau, V. (2008). Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R. Ross. *Phycological Research*, *56*, 238-245.
- Le Lann, K., Connan, S. and Stiger-Pouvreau, V. (2012a) Phenology, TPC and size-fractioning phenolics variability in temperate Sargassaceae (Phaeophyceae, Fucales) from Western Brittany: Native versus introduced species. *Marine Environmental Research*, *80*, 1–11.
- Le Lann, K., Ferret, C., Vanmee, E., Spagnol, C., Lhuillery, M., Payri, C. and Stiger-Pouvreau, V. (2012b). Total phenolic, size-fractionated phenolics and fucoxanthin content of tropical Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) from the South Pacific Ocean: Spatial and specific variability. *Phycological Research*, *60*, 37-50.
- Le Lann, K., Surget, G., Couteau, C., Coiffard, L., Cérantola, S., Gaillard, F., Larnicol, M., Zubia, M., Guérard, F., Poupart, N. and Stiger-Pouvreau, V. (2016). Sunscreen, antioxidant, and bactericide capacities of phlorotannins from the brown macroalga *Halidrys siliquosa*. *Journal of Applied Phycology*, *28*, 3547-3559.
- Lemesheva, V. and Tarakhovskaya, E. (2018). Physiological functions of phlorotannins. *Biological Communications*, *63*, 70-76.
- Łęska, B., Messyasz, B. and Schroeder, G. (2018). Application of algae biomass and algae extracts in cosmetic formulations. In K. Chojnacka, P. P. Wiczorek, G. Schroeder and I. Michalak (Eds.), *Algae Biomass: Characteristics and Applications* (pp. 89–101). Springer.
- Lesueur, M., & Comparini, C. (2015). La filière des algues dans le monde, en Europe, en France. Synthèse

de résultats. Cellule études et transfert, AGROCAMPUS OUEST.

Leyton, A., Pezoa-Conte, R., Barriga, A., Buschmann, A. H., Mäki-Arvela, P., Mikkola, J. P. and Lienqueo, M. E. (2016). Identification and efficient extraction method of phlorotannins from the brown seaweed *Macrocystis pyrifera* using an orthogonal experimental design. *Algal Research*, *16*, 201-208.

Li, K., Li, X. M., Ji, N. Y. and Wang, B. G. (2008a). Bromophenols from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* with DPPH radical scavenging activity. *Journal of Natural Products*, *71*, 28-30.

Li, Y., Lee, S. H., Le, Q. T., Kim, M. M. and Kim, S. K. (2008b). Anti-allergic effects of phlorotannins on histamine release via binding inhibition between IgE and Fc epsilonRI. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 12073-12080.

Li, Y. X., Wijesekara, I., Li, Y. and Kim, S. K. (2011). Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*, *46*, 2219-2224.

Lijun, H., Nianjun, X., Jiangong, S., Xiaojun, Y. and Chengkui, Z. (2005). Isolation and pharmacological activities of bromophenols from *Rhodomela confervoides*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, *23*, 226-229.

Lim, T. Y., Lim, Y. Y. and Yule, C. M. (2009). Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species. *Food Chemistry*, *114*, 594-599.

Lin, J. W., Chiang, H. M., Lin, Y. C. and Wen, K. C. (2008). Natural products with skin-whitening effects. *Journal of Food and Drug Analysis*, *16*, 1-10.

Liu, M., Hansen, P. E. and Lin, X. (2011). Bromophenols in marine algae and their bioactivities. *Marine Drugs*, *9*, 1273-1292.

Liu, N., Fu, X., Duan, D., Xu, J., Gao, X. and Zhao, L. (2018). Evaluation of bioactivity of phenolic compounds from the brown seaweed of *Sargassum fusiforme* and development of their stable emulsion. *Journal of Applied Phycology*, *30*, 1955-1970.

Lopes, G., Pinto, E., Andrade, P. B. and Valentão, P. (2013). Antifungal activity of phlorotannins against

dermatophytes and yeasts: approaches to the mechanism of action and influence on *Candida albicans* Virulence Factor. *PLoS ONE*, *8*, e72203.

Lordan, S., Smyth, T. J., Soler-Vila, A., Stanton, C. and Paul Ross, R. (2013). The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry*, *141*, 2170-2176.

Lüder, U. H. and Clayton, M. N. (2004). Induction of phlorotannins in the brown macroalga *Ecklonia radiata* (Laminariales, Phaeophyta) in response to simulated herbivory - The first microscopic study. *Planta*, *218*, 928-937.

Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, *224*, 164-175.

M

Ma, N. L., Teh, K. Y., Lam, S. S., Kaben, A. M. and Cha, T. S. (2015). Optimization of cell disruption methods for efficient recovery of bioactive metabolites via NMR of three freshwater microalgae (Chlorophyta). *Bioresource Technology*, *190*, 536-542.

Mabeau, S. and Fleurence, J. (1993). Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science and Technology*, *4*, 103-107.

Machu, L., Misurcova, L., Vavra Ambrozova, J., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J. and Jurikova, T. (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules*, *20*, 1118-1133.

Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K. and Miyashita, K. (2005). Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *332*, 392-397.

Maeda-Yamamoto, M. and Tachibana, H. (2012). Anti-allergic action of *O*-methylated EGCG in green tea cultivar benifuuki. *Journal of Food and Drug Analysis*, *20*, 313-317.

Magnusson, M., Yuen, A. K. L., Zhang, R., Wright, J. T., Taylor, R. B., Maschmeyer, T. and De Nys, R. (2017). A

- comparative assessment of microwave assisted (MAE) and conventional solid-liquid (SLE) techniques for the extraction of phloroglucinol from brown seaweed. *Algal Research*, 23, 28-36.
- Mancini-Filho, J., Novoa, A. V., González, A. E. B., de Andrade-Wartha, E. R.S. and Portari Mancini, D.A. (2009). Free phenolic acids from the seaweed *Halimeda monile* with antioxidant effect protecting against liver injury. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64, 657-663.
- Maréchal, J. P., Culioli, G., Hellio, C., Thomas-Guyon, H., Callow, M. E., Clare, A. S. and Ortalo-Magné, A. (2004). Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 313, 47-62.
- Martínez, J. H. I. and Castañeda, H. G. T. (2013). Preparation and chromatographic analysis of phlorotannins. *Journal of Chromatographic Science*, 51, 825-838.
- Masuda, M., Kawaguchi, S., Abe, T., Kawamoto, T. and Suzuki, M. (2002). Additional analysis of chemical diversity of the red algal genus *Laurencia* (Rhodomelaceae) from Japan. *Phycological Research*, 50, 135-144.
- Matanjan, P., Mohamed, S., Mustapha, N. M., Muhammad, K. and Ming, C. H. (2008). Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *Journal of Applied Phycology*, 20, 367-373.
- Mayer, A. M. S., Paul, V. J., Fenical, W., Norris, J. N., De Carvalho, M. S. and Jacobs, R. S. (1993). Phospholipase A2 inhibitors from marine algae. In A.R.O. Chapman, M. T. Brown and M. Lahaye (Eds) *Fourteenth International Seaweed Symposium* (pp. 521-529), Springer, Dordrecht.
- Mazarrasa, I., Olsen, Y. S., Mayol, E., Marbà, N. and Duarte, C. M. (2014). Global unbalance in seaweed production, research effort and biotechnology markets. *Biotechnology Advances*, 32, 1028-1036.
- Mazzoncini, J. P. Jr, Crowell, C. B. and Kang, C. S. (2010). Human metapneumovirus: an emerging respiratory pathogen. *The Journal of Emergency Medicine*, 38, 456-459.
- Meier, J. J. (2012). GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 8, 728-742.
- Mendes, G., Soares, A. R., Sigiliano, L., Machado, F., Kaiser, C., Romeiro, N., Gestinari, L., Santos, N. and Romanos, M. T. V. (2011). *In vitro* anti-HMPV activity of meroditerpenoids from marine alga *Styopodium zonale* (Dictyotales). *Molecules*, 16, 8437-8450.
- Meslet-Cladiere, L., Delage, L., Leroux, C. J.-J., Goullitquer, S., Leblanc, C., Creis, E., Ar Gall, E., Stiger-Pouvreau, V., Czjzek, M. and Potin, P. (2013). Structure/function analysis of a type III polyketide synthase in the brown alga *Ectocarpus siliculosus* reveals a biochemical pathway in phlorotannin monomer biosynthesis. *The Plant Cell*, 25, 3089-3103.
- Mesnildrey, L., Jacob, C., Frangoudes, K., Reunavot, M. and Lesueur, M. (2012). *Seaweed industry in France. Report Interreg program NETALGAE*.
- Meyer, K. (1947). The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiological Reviews*, 27, 335-359.
- Mhadhebi, L., Dellai, A., Clary-Laroche, A., Ben Said, R., Robert, J. and Bouraoui, A. (2012). Anti-inflammatory and antiproliferative activities of *Cystoseira compressa*. *Drug Development Research*, 73, 82-89.
- Mhadhebi, L., Laroche-Clary, A., Robert, J. and Bouraoui, A. (2011). Antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative activities of organic fractions from the Mediterranean brown seaweed *Cystoseira sedoides*. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 89, 911-921.
- Michalak, I and Chojnacka, K. (2014). Review, Algal extracts: Technology and advances. *Engineering in Life Science*, 14, 581-591.
- Moir, S., Chun, T. W. and Fauci, A. S. (2011). Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 223-248.

- Montecinos, A. (2016) Species delimitation and hybridization in the brown seaweed *Ectocarpus* complex. Populations and Evolution. Université Pierre et Marie Curie – Paris VI, PhD.
- Montero, L., Sánchez-Camargo, A. P., García-Cañas, V., Tanniou, A., Stiger-Pouvreau, V., Russo, M., Rastrelli, L., Cifuentes, A., Herrero, M. and Ibáñez, E. (2016). Anti-proliferative activity and chemical characterization by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry of phlorotannins from the brown macroalga *Sargassum muticum* collected on North-Atlantic coasts. *Journal of Chromatography A*, 1428, 115–125.
- Moreira, R., Sineiro, J., Chenlo, F., Arufe, S. and Díaz-Varela, D. (2017). Aqueous extracts of *Ascophyllum nodosum* obtained by ultrasound-assisted extraction: effects of drying temperature of seaweed on the properties of extracts. *Journal of Applied Phycology*, 29, 3191-3200.
- Morita, T., Niwa, K., Fujimoto, K., Kasai, H., Yamada, H., Nishiuchi, K., Sakamoto, T., Godo, W., Taino, S., Hayashi, Y., Takeno, K., Nishigaki, T., Fujiwara, K., Aratake, H., Kamonoshita, S., Hasimoto, H., Kobayashi, T., Otosaka, S. and Imanaka, T. (2010). Detection and activity of iodine-131 in brown algae collected in the Japanese coastal areas. *Science of the Total Environment*, 408, 3443–3447.
- Moubayed, N. M. S., Al Hourri, J. H., Al Khulaifi, M. M. and Al Farraj, D. A. (2017). Antimicrobial, antioxidant properties and chemical composition of seaweeds collected from Saudi Arabia (Red Sea and Arabian Gulf). *Saudi Journal of Biological Science*, 24, 162-169.
- Mukherjee, A., and Patel, J. S. (2019). Seaweed extract: biostimulator of plant defense and plant productivity. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1–6.
- Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B. and Gissmann, L. (2006). HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24, S1-S10.
- Murray, M., Dordevic, A. L., Bonham, M. P. and Ryan, L. (2018c). Do marine algal polyphenols have antidiabetic, antihyperlipidemic or anti-inflammatory effects in humans? A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 2039-2054.
- Murray, M., Dordevic, A. L., Ryan, L. and Bonham, M. P. (2018a). Phlorotannins and macroalgal polyphenols: potential as functional food ingredients and role in health promotion. In V. Rani and U. Yadav (Eds) *Functional Food and Human Health* (pp. 27-58), Springer.
- Murray, M., Dordevic, A., Ryan, L. and Bonham, M. (2018b). An emerging trend in functional foods for the prevention of cardiovascular disease and diabetes: Marine algal polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 1342-1358.
- ## N
- Nakamura, T., Nagayama, K., Uchida, K. and Tanaka, R. (1996). Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fisheries Science*, 62, 923-926.
- Nakai, M., Kageyama, N., Nakahara, K. and Miki, W. (2006). Original article phlorotannins as radical scavengers from the extract of *Sargassum ringgoldianum*. *Marine Biotechnology*, 8, 409–414.
- Nakayasu, S., Soegima, R., Yamaguchi, K. and Oda, T. (2009). Biological activities of fucose-containing polysaccharide ascophyllan isolated from the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 961–964.
- Nash, J. F. and Tanner, P. R. (2014). Relevance of UV filter/sunscreen product photostability to human safety. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 30, 88-95.
- Neu, H. C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257, 1064-1073.
- Novoa, A. V., Andrade-Wartha, E. R. S., Fallarero Linares, A., Mara de O. e Silva, A., Genovese, M. I., González, A. E. B., Vuorela, P., Costa, A. and Mancini-Filho, J. (2011). Antioxidant activity and possible bioactive components in hydrophilic and lipophilic fractions from the seaweed *Halimeda incrassata*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21, 53-57.
- Nwosu, F., Morris, J., Lund, V. A., Stewart, D., Ross, H. A. and McDougall, G. J. (2011). Anti-proliferative and

potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chemistry*, 126, 1006-1012.

O

Oh, K. B., Lee, J. H., Chung, S. C., Shin, J., Shin, H. J., Kim, H. K. and Lee, H. S. (2008). Antimicrobial activities of the bromophenols from the red alga *Odonthalia corymbifera* and some synthetic derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18, 104-108.

Olokoba, A. B., Obateru, O.A. and Olokoba, L.B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Medical Journal*, 27, 269-273.

Ondetti, M. A. and Cushman, D. W. (1982). Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*, 51, 283-308.

Onofrejevá, L., Vašíčková, J., Klejdus, B., Stratil, P., Mišurcová, L., Kráčmar, S., Kopecký, J. and Vacek, J. (2010). Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 464-470.

O'Sullivan, A. M., O'Callaghan, Y. C., O'Grady, M. N., Hayes, M., Kerry, J. P. and O'Brien, N. M. (2013) The effect of solvents on the antioxidant activity in Caco-2 cells of Irish brown seaweed extracts prepared using accelerated solvent extraction (ASE®). *Journal of Functional Foods*, 5, 940-948.

O'Sullivan, A. M., O'Callaghan, Y. C., O'Grady, M. N., Quéguineur, B., Hanniffy, D., Troy, D. J., Kerry, J. P. and O'Brien, N. M. (2011). *In vitro* and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. *Food Chemistry*, 126, 1064-1070.

P

Padilla, M., Palma, M. and Barroso, C. G. (2005). Determination of phenolics in cosmetic creams and

similar emulsions. *Journal of Chromatography A*, 1091, 83-88.

Pádua, D., Rocha, E., Gargiulo, D. and Ramos, A. A. (2015). Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. *Phytochemistry Letters*, 14, 91-98.

Paige-Stout, E., Prudhomme, J., Roch, K. L., Fairchild, C. R., Franzblau, S. G., Aalbersberg, W., Hay, M. E. and Kubanek, J. (2010). Unusual antimalarial meroditerpenes from tropical red macroalgae. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20, 5662-5665.

Paiva, L., Lima, E., Neto, A.I., Marccone, M. and Baptista, J. (2016). Health-promoting ingredients from four selected Azorean macroalgae. *Food Research International*, 89, 432-438.

Pangestuti, R., Siahaan, E. and Kim, S. K. (2018). Photoprotective substances derived from marine algae. *Marine Drugs*, 16, 399.

Parniakov, O., Apicella, E., Koubaa, M., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N., Pataro, G., Ferrari, G. and Vorobiev, E. (2015). Ultrasound-assisted green solvent extraction of high-added value compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. *Bioresource Technology*, 198, 262-267.

Parrish, J. A, Jaenicke, K. F. and Anderson, R. R. (1982). Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochemistry and Photobiology*, 36, 187-191.

Parys, S., Kehraus, S., Pete, R., Küpper, F.C., Glombitza, W. and König G.M. (2009) Seasonal variation of polyphenolics in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *European Journal of Phycology*, 44, 331-338.

Parys, S., Rosenbaum, A., Kehraus, S., Reher, G., Glombitza, K. W. and König, G. M. (2007). Evaluation of quantitative methods for the determination of polyphenols in algal extracts. *Journal of Natural Products*, 70, 1865-1870.

Pasquet, V., Chérouvrier, J. R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J. M., Bérard, J. B., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T.,

- Cadoret, J-P. and Picot, L. (2011). Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*, 46, 59-67.
- Paufique, J. (2003). Method for obtaining an active principle from *Agarum cribosum*, particularly for prevention of pigmentation. Patent WO2003061618 A1.
- Pavia, H. and Aberg, P. (1996) Spatial variation in polyphenolic content of *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyta). *Hydrobiologia*, 326/327, 199-203.
- Pavia, H. and Brock, E. (2000). Extrinsic factors influencing phlorotannin production in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series*, 193, 285-294.
- Pavia, H., Cervin, G., Lindgren, A. and Åberg, P. (1997). Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series*, 157, 139-146.
- Pawankar, R. (2014). Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. *World Allergy Organization Journal*, 7, 12.
- Pellegrini, L., Pellegrini, M. and André, G. (2003b). Extrait d'algue marine du genre *Cystoseira* et utilisation dans les produits de soins. Patent FR2838341 A1.
- Pellegrini, L., Pellegrini, M. and Villar, C. (2016). Utilisation d'au moins un extrait de macroalgue pour augmenter la synthèse de mélanine dans les melanocytes. Patent FR3032351 A1.
- Pellegrini, M., André, G. and Pellegrini, L. (2003a). Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques renfermant un extrait de macroalgue marine comme principe actif anti-oxydant et/ou anti-pollution. Patent FR2838342 A1.
- Pellegrini, M., Pellegrini, L. and André, G. (2003c). Utilisation d'un extrait d'algue brune dans les domaines cosmétique et dermatologique. Patent FR2838340 A1.
- Pellegrini, M. and Pellegrini, L. (2003). Utilisation d'un extrait d'une algue brune du genre *Halidrys* dans les domaines cosmétiques et/ou dermatologiques. Patent FR2942136 A1.
- Pelligini, M. and Pellegrini, L. (2009). Utilisation d'un extrait d'une algue brune du genre *Halidrys* dans les domaines cosmétiques et/ou dermatologiques. Patent FR2942136 A1.
- Peng, J., Yuan, J. P., Wu, C. F. and Wang, J. H. (2011). Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: Metabolism and bioactivities relevant to human health. *Marine Drugs*, 9, 1806-1828.
- Pereira, D. M., Cheel, J., Areche, C., San-Martin, A., Roviroso, J., Silva, L. R., Valentao, P. and Andrade, P. B. (2011). Anti-proliferative activity of meroditerpenoids isolated from the brown alga *Stypopodium flabelliforme* against several cancer cell lines. *Marine Drugs*, 9, 852-862.
- Pérez, R., Kaas, R., Barbaroux, O., Arbault, S., Le Bayon, N. and Moigne, J.-Y. (1990). Technique de culture pour les côtes Bretonnes de l'algue alimentaire *Undaria pinnatifida*. Tableau de Marché - Etude Economique, 1-66.
- Pérez, J., Falqué, E. and Domínguez, H. (2016). Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Marine Drugs*, 14, 52.
- Pérez-Rodríguez, E., Aguilera, J. and Figueroa, F. L. (2003). Tissular localization of coumarins in the green alga *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser: a photoprotective role? *Journal of Experimental Botany*, 54, 1093-1100.
- Pérez-Rodríguez, E., Aguilera, J., Gomez, I. and Figueroa, F. L. (2001). Excretion of coumarins by the Mediterranean green alga *Dasycladus vermicularis* in response to environmental stress. *Marine Biology*, 139, 633-639.
- Philippe, M. (2013) Récolte des algues de rive, Guide de bonnes pratiques, Inter Bio Bretagne.
- Pilar Sánchez-Camargo, A., Montero, L., Stiger-Pouvreau, V., Tanniou, A., Cifuentes, A., Herrero, M. and Ibáñez, E. (2016) Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae. *Food Chemistry*, 192, 67-74.

- Pimentel, F., Alves, R., Rodrigues, F. and P. P. Oliveira, M. (2017). Macroalgae-derived ingredients for cosmetic industry-An update. *Cosmetics*, 5, 2.
- Pinteus, S., Silva, J., Alves, C., Horta, A., Thomas, O. P. and Pedrosa, R. (2017). Antioxidant and cytoprotective activities of *Fucus spiralis* seaweed on a human cell *in vitro* model. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1-14.
- Plaza, A., Keffer, J.L., Bifulco, G., Lloyd, J.R. and Bewley, C.A. (2010a). Chrysohaentins A–H, antibacterial bisdiarylbutene macrocycles that inhibit the bacterial cell division protein FtsZ. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 9069-9077.
- Plaza, M., Cifuentes, A. and Ibañez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 31-39.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Herrero, M., Señoráns, F. J., Ibañez, E. (2010b). Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 450-455.
- Plouguerné, E., Le Lann, K., Connan, S., Jechoux, G., Deslandes, E. and Stiger-Pouvreau, V. (2006). Spatial and seasonal variation in density, reproductive status, length and phenolic content of the invasive brown macroalga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt along the coast of Western Brittany (France). *Aquatic Botany*, 85, 337-344.
- Poojary, M. M., Barba, F. J., Aliakbarian, B., Donsi, F., Pataro, G., Dias, D. A. and Juliano, P. (2016). Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Marine Drugs*, 14, 1–34.
- Poyato, C., Thomsen, B. R., Hermund, D. B., Ansorena, D., Astiasarán, I., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H. G. and Jacobsen, C. (2016). Antioxidant effect of water and acetone extracts of *Fucus vesiculosus* on oxidative stability of skin care emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118, 1-11.
- Prabakaran, P. and Ravindran, A. D. (2011). A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 150-154.
- Praiboon, J., Palakas, S., Noiraksa, T. and Miyashita, K. (2018). Seasonal variation in nutritional composition and anti-proliferative activity of brown seaweed, *Sargassum oligocystum*. *Journal of Applied Phycology*, 30, 101-111.
- Prat, D., Wells, A., Hayler, J., Sneddon, H., McElroy, C. R., Abou-Shehada, S. and Dunn, P. J. (2016). CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. *Green Chemistry*, 18, 288-296.
- Prodanov, M., Garrido, I., Vacas, V., Lebrón-Aguilar, R., Dueñas, M., Gómez-Cordovés, C. and Bartolomé, B. (2008) Ultrafiltration as alternative purification procedure for the characterization of low and high molecular-mass phenolics from almond skin. *Analytica Chimica Acta*, 609, 241-251.
- Pronyk, C. and Mazza, G. (2009). Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. *Journal of Food Engineering*, 95, 215–226.
- Prost-Squarcioni, C., Fraitag, S., Heller, M. and Boehm, N. (2008). Functional histology of dermis. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 135, 5–20.
- Proteau, P. J., Gerwick, W. H., Garcia-Pichel, F. and Castenholz, R. (1993). The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. *Experientia*, 49, 825-829.
- Puspita, M., Déniel, M., Widowati, I., Radjasa, O. K., Douzenel, P., Marty, C., Vandanjon, L. and Bourgougnon, N. (2017). Total phenolic content and biological activities of enzymatic extracts from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Journal of Applied Phycology*, 29, 2521-2537.
- Q**
- Qin, Y. (2018). Bioactive seaweeds for food applications: natural ingredients for healthy diets (1st ed.). Elsevier, Jiaying, China.
- Quéguineur, B., Goya, L., Ramos, S., Martín, M. A., Mateos, R., Guiry, M. D. and Bravo, L. (2013). Effect of phlorotannin-rich extracts of *Ascophyllum nodosum* and *Himantalia elongata* (Phaeophyceae) on cellular

oxidative markers in human HepG2 cells. *Journal of Applied Phycology*, 25, 1–11.

R

Ragan, M. A. and Jensen, A. (1978). Quantitative studies on brown algal phenols. II. Seasonal variation in polyphenol content of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. and *Fucus vesiculosus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 34, 245–258.

Ragan, M. A. and Glombitza, K. W. (1986). Phlorotannins, brown algal polyphenols. In F. E. Round and D. J. Chapman (Eds) *Progress in Phycological Research* (pp. 129–241), Biopress Ltd: Bristol, UK.

Raisz, L. G. (2001). Pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 2, 5–12.

Rajauria, G., Jaiswal, A. K., Abu-Gannam, N. and Gupta, S. (2012). Antimicrobial, antioxidant and free radical-scavenging capacity of brown seaweed *Himanthalia elongata* from western coast of Ireland. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 322–335.

Rajauria, G., Foley, B. and Abu-Ghannam, N. (2016). Identification and characterization of phenolic antioxidant compounds from brown Irish seaweed *Himanthalia elongata* using LC-DAD–ESI-MS/MS. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 37, 261–268.

Rajauria, G. (2018). Optimization and validation of reverse phase HPLC method for qualitative and quantitative assessment of polyphenols in seaweed. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 148, 230–237.

Ramos-e-Silva, M., Celem, L. R., Ramos-e-Silva, S. and Fucci-da-Costa, A. P. (2013). Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*, 31, 750–758.

Rao, L. G. and Rao, A. V. (2015). Oxidative stress and antioxidants in the risk of osteoporosis—role of phytochemical antioxidants lycopene and polyphenol-containing nutritional supplements. In A. V. Rao and L. G. Rao (Eds) *Phytochemicals, Isolation,*

Characterisation and Role in Human Health (pp. 247–260), InTech, Rijeka.

Règlement CE n° 1907/2006 du 18/06/2006, consulté sur <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:136:0003:0280:fr:PDF>

Règlement cosmétique CE n° 1223/2009 du 30/11/2009, consulté sur <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:fr:PDF>

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 1603–1616.

Riani, M. K. L., Anwar, E. and Nurhayati, T. (2018). Antioxidant and anti-collagenase activity of *Sargassum plagyophyllum* extract as an anti-wrinkle cosmetic ingredient. *Pharmacognosy*, 10, 932–936.

Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N. and Pohl, C. (1996). Accelerated Solvent Extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68, 1033–1039.

Riggs, B. L., Khosla, S. and Melton, L. J. (1998). A unitary model for involitional osteoporosis: Estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13, 763–773

Ríos, J. L. and Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80–84.

Robles Centeno, P. O. and Ballantine, D. L. (1999). Effects of culture conditions on production of antibioticly active metabolites by the marine alga *Spyridia filamentosa* (Ceramiaceae, Rhodophyta). I. Light. *Journal of Applied Phycology*, 11, 217–224.

Rocha, D., Seca, A. and Pinto, D. (2018). Seaweed secondary metabolites *in vitro* and *in vivo* anticancer activity. *Marine Drugs*, 16, 410.

Rodrigues, D., Sousa, S., Silva, A., Amorim, M., Pereira, L., Rocha-Santos, T. A. P., Gomes, A. M. P., Duarte, A. C. and Freitas, A. C. (2015). Impact of enzyme- and

- ultrasound-assisted extraction methods on biological properties of red, brown, and green seaweeds from the central west coast of Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 3177-3188.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Lage-Yusty, M. A. and López-Hernández, J. (2010). Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. *Food Chemistry*, *121*, 634-638.
- Rodríguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Señorans, F. J., Cifuentes, A. and Ibañez, E. (2010). Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *51*, 456-463.
- Roh, M.-K., Uddin, M. S. and Chun, B.-S. (2008) Extraction of fucoxanthin and polyphenol from *Undaria pinnatifida* using supercritical carbon dioxide with co-solvent. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *13*, 724-729.
- Roleda, M. Y., Lüder, U. H. and Wiencke, C. (2010). UV-susceptibility of zoospores of the brown macroalga *Laminaria digitata* from Spitsbergen. *Polar Biology*, *33*, 577-588.
- Rönnerberg, O. and Ruokolahti, C. (1986) Seasonal variation of algal epiphytes and phenolic content of *Fucus vesiculosus* in a northern Baltic archipelago. *Finnish Zoological and Botanical Publishing Board*, *23*, 317-323.
- Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M. C. and Durand, E. (2017). Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for phenolic compounds extraction: overview, challenges, and opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*, 3591-3601.
- Ryu, B., Li, Y., Qian, Z.-J., Kim, M.-M. and Kim, S.-K. (2009). Differentiation of human osteosarcoma cells by isolated phlorotannins is subtly linked to COX-2, iNOS, MMPs, and MAPK signaling: Implication for chronic articular disease. *Chemico-Biological Interactions*, *179*, 192-201.
- Ryu, M. J., Kim, A. D., Kang, K. A., Chung, H. S., Kim, H. S., Suh, I. S., Chang, W. Y. and Hyun, J. W. (2013). The green algae *Ulva fasciata* Delile extract induces apoptotic cell death in human colon cancer cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, *49*, 74-81.
- Ryu, Y. B., Jeong, H. J., Yoon, S. Y., Park, J. Y., Kim, Y. M., Park, S. J., Rho, M. C., Kim, S. J. and Lee, W. S. (2011). Influenza virus neuraminidase inhibitory activity of phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia cava*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 6467-6473.
- S
- Sáez, C. A., Roncarati, F., Moenne, A., Moody, A. J. and Brown, M. T. (2015). Copper-induced intra-specific oxidative damage and antioxidant responses in strains of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* with different pollution histories. *Aquatic Toxicology*, *159*, 81-89.
- Safafar, H., Van Wagenen, J., Møller, P. and Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Marine Drugs*, *13*, 7339-7356.
- Sallenave, J. M., Xing, Z., Simpson, A. J., Graham, F. L. and Gauldie, J. (1998). Adenovirus-mediated expression of an elastase-specific inhibitor (elafin): A comparison of different promoters. *Gene Therapy*, *5*, 352-360.
- Samee, H., Li, Z., Lin, H., Khalid, J. and Guo, Y. (2009). Anti-allergic effects of ethanol extracts from brown seaweeds. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, *10*, 147-153.
- Sánchez-Camargo, A. D. P., Montero, L., Stiger-Pouvreau, V., Tanniou, A., Cifuentes, A., Herrero, M. and Ibañez, E. (2016). Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae. *Food Chemistry*, *192*, 67-74.
- Sandsdalen, E., Haug, T., Stenvag, K. and Styrvold, O. (2003). The antibacterial effect of a polyhydroxylated fucophlorethol from the marine brown alga, *Fucus vesiculosus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *19*, 777-782.

- Santoyo, S., Plaza, M., Jaime, L., Ibañez, E., Reglero, G. and 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, 909–917.
- Sanjeewa, K. K. A., Kim, E. A., Son, K. T. and Jeon, Y. J. (2016). Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: A review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162, 100–105.
- Sanjeewa, K. K. A. and Jeon, Y. (2018). Edible brown seaweeds: a review. *Journal of Food Bioactives*, 2, 37–50.
- Santana, C. M., Ferrera, Z. S., Padrón, M. E. T. and Rodríguez, J. J. S. (2009). Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: New approaches. *Molecules*, 14, 298–320.
- Santoso, J., Yoshie-Stark, Y. and Suzuki, T. (2004). Anti-oxidant activity of methanol extracts from Indonesian seaweeds in an oil emulsion model. *Fisheries Science*, 70, 183–188.
- Santoyo, S., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Señorans, F. J. and Ibañez, E. (2009). Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1213–1218.
- Saravana, P. S., Tilahun, A., Cho, Y.-J., Choi, J. H., Park, Y. B., Woo, H. C. and Chun, B. S. (2017). Influence of co-solvents on fucoxanthin and phlorotannin recovery from brown seaweed using supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 120, 295–303.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287–306.
- Schiener, P., Black, K. D., Stanley, M. S. and Green, D. H. (2014). The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. *Journal of Applied Phycology*, 27, 363–373.
- Schoenwaelder, M.E.A. and Wiencke, C. (2000). Phenolic compounds in the embryo development of several Northern Hemisphere furoids. *Plant Biology*, 2, 24–33.
- Senthilkumar, K., Venkatesan, J. and Kim, S.-K. (2014). Marine derived natural products for osteoporosis. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 4, 1–7.
- Serive, B., Kaas, R., Bérard, J.-B., Pasquet, V., Picot, L. and Cadoret, J.-P. (2012). Selection and optimization of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 124, 311–320.
- Shalaby, E. (2011). Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signaling and Behavior*, 6, 1338–1350.
- Shang, Y. F., Kim, S. M., Lee, W. J. and Um, B. H. (2011). Pressurized liquid method for fucoxanthin extraction from *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111, 237–241.
- Shi, D., Xu, F., He, J., Li, J., Fan, X. and Han, L. (2008). Inhibition of bromophenols against PTP1B and anti-hyperglycemic effect of *Rhodomela confervoides* extract in diabetic rats. *Science Bulletin*, 53, 2476–2479.
- Shibata, T., Fujimoto, K., Nagayama, K., Yamaguchi, K. and Nakamura, T. (2002). Inhibitory activity of brown algal phlorotannins against hyaluronidase. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 703–709.
- Shibata, T., Hama, Y., Miyasaki, T., Ito, M. and Nakamura, T. (2006). Extracellular secretion of phenolic substances from living brown algae. *Journal of Applied Phycology*, 18, 787–794.
- Shibata, T., Kawaguchi, S., Hama, Y., Inagaki, M., Yamaguchi, K. and Nakamura, T. (2004). Local and chemical distribution of phlorotannins in brown algae. *Journal of Applied Phycology*, 16, 291–296.
- Shibata, T., Nagayama, K., Tanaka, R., Yamaguchi, K. and Nakamura, T. (2003). Inhibitory effects of brown algal phlorotannins on secretory phospholipase A₂s, lipoxygenases and cyclooxygenases. *Journal of Applied Phycology*, 15, 61–66.
- Shim, S. Y., Quang-To, L., Lee, S. H. and Kim, S. K. (2009). *Ecklonia cava* extract suppresses the high-affinity IgE

- receptor, F epsilonRI expression. *Food and Chemical Toxicology*, *47*, 555-560.
- Shin, H., Cho, A. R., Kim, D. Y., Munkhbayer, S., Choi, S. J., Jang, S., Kim, S. H., Shin, H. C. and Kwon, O. (2016). Enhancement of human hair growth using *Ecklonia cava* polyphenols. *Annals of Dermatology*, *28*, 15-21.
- Shoeib, N. A., Bibby, M. C., Blunden, G., Linley, P. A., Swaine, D. J., Wheelhouse, R. T. and Wright, C. W. (2004). *In vitro* cytotoxic activities of the major bromophenols of the red alga *Polysiphonia lanosa* and some novel synthetic isomers. *Journal of Natural Products*, *67*, 1445-1449.
- Silva, T. C., Pereira, D. M., Valentão, P. and Andrade, P. B. (2017). Phospholipase A2 Inhibitors of Marine Origin. In P. B. Andrade, P. Valentão and D. M. Pereira (Eds) *Natural Products Targeting Clinically Relevant Enzymes* (pp. 69-92), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Singh, A., Holvoet, S. and Mercenier, A. (2011). Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases: Polyphenols alleviate allergic inflammation. *Clinical and Experimental Allergy*, *41*, 1346-1359.
- Singh, G. and Kumar, J. (2018). Artificial and natural photoprotective compounds. In: R. P. Rastogi (Ed) *Sunscreens: Source, Formulations, Efficacy and Recommendations* (pp. 153-199), Nova Science Pub Inc.
- Singh, I. P. and Bharate, S. B. (2006). Phloroglucinol compounds of natural origin. *Natural Product Reports*, *23*, 558-591.
- Sinha, R. P., Singh, S. P. and Häder, D-P. (2007). Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *89*, 29-35.
- Sineiro Torres, J., Sánchez Guerrero, M. and Núñez García, M. J. (2013). Antioxidant extract from brown macroalgae and preparation process. Patent ES2441469B2.
- Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S. and Wortsman, J. (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews*, *84*, 1155-1228.
- Soares, A. R. (2015). Extraction, isolation, and identification of sesquiterpenes from *Laurencia* species. In D. B. Stengel and S. Connan (Eds) *Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols* (pp. 225–252), Springer, New-York.
- Soares, A. R., Abrantes, J. L., Souza, T. M. L., Fontes, C. F. L., Pereira, R. C., Frugulhetti, I. C. D. P. P. and Teixeira, V. L. (2007). *In vitro* antiviral effect of meroditerpenes isolated from the Brazilian seaweed *Styopodium zonale* (Dictyotales). *Planta Medica*, *73*, 1221-1224.
- Socio-economic contribution of the european cosmetics industry (2018) *Cosmetics Europe, the personal care association*. 1-44. <https://www.cosmeticseurope.eu/download/NjVMW DNaVGJXcUJpZVhxMOIXN3BxUT09>
- Solano, F., Briganti, S., Picardo, M. and Ghanem, G. (2006). Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment cell research*, *19*, 550-571.
- Son, Y. S., Ullah, H. M. A., Elfadl, A. K., Ghim, S. G., Chung, M. J., Kim, Y. D., Lee, E. J., Kang, K. K. and Jeong, K. S. (2018). Inhibition of formation of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats by edible green algae *Capsosiphon fulvescens* and brown algae *Hizikia fusiforme*. *In Vivo*. *32*, 101-108.
- Sonksen, P. and Sonksen, J. (2000). Insulin: understanding its action in health and disease. *British Journal of Anaesthesia*, *85*, 69-79.
- Spavieri, J., Allmendinger, A., Kaiser, M., Casey, R., Hingley-Wilson, S., Lalvani, A., Guiry, M. D., Blunden, G. and Tasdemir, D. (2010). Antimycobacterial, antiprotozoal and cytotoxic potential of twenty-one brown algae (Phaeophyceae) from British and Irish waters. *Phytotherapy Research*, *24*, 1724–1729.
- Starr, R. C. and Zeikus, J. A. (1993) UTEX – The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *Journal of phycology*, *29*, 1-106.
- Steevensz, A. J., MacKinnon, S. L., Hankinson, R., Craft, C., Connan, S., Stengel, D. B. and Melanson, J. E. (2012). Profiling phlorotannins in brown macroalgae by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry: phlorotannins in seaweed by LC-HRMS. *Phytochemical Analysis*, *23*, 547-553.

- Stengel, D. B., Connan, S. and Popper, Z. A. (2011). Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*, 29, 483-501.
- Stengel, D. B. and Connan, S. (2015). Marine Algae: a Source of Biomass for Biotechnological Applications. In D. B. Stengel & S. Connan (Eds.), *Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols* (Vol. 1308, pp. 103–108). Springer Science+Business Media.
- Stévant, P., Rebours, C. and Chapman, A. (2017). Seaweed aquaculture in Norway: recent industrial developments and future perspectives. *Aquaculture International*, 25, 1373–1390.
- Stevenson, C. S., Capper, E. A., Roshak, A. K., Marquez, B., Eichman, C., Jackson, J. R., Mattern, M., Gerwick, W. H., Jacobs, R. S. and Marshall, L. A. (2002). The identification and characterization of the marine natural product scytonemin as a novel antiproliferative pharmacophore. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303, 858-866.
- Stiger, V., Deslandes, E. and Payri, C. E. (2004). Phenolic contents of two brown algae, *Turbinaria ornata* and *Sargassum mangarevense* on Tahiti (French Polynesia): Interspecific, ontogenic and spatio-temporal variations. *Botanica Marina*, 47, 402-409.
- Stiger-Pouvreau, V. and Guérard, F. (2018). Bio-inspired molecules extracted from marine macroalgae: a new generation of active ingredients for cosmetics and human health. In S. La Barre and S. Bates (Eds) *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules* (pp. 709-746), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Stiger-Pouvreau, V., Jégou, C., Cérantola, S., Guérard, F. and Le Lann, K. (2014). Phlorotannins in Sargassaceae Species from Brittany (France). *Advances in Botanical Research*, 71, 379-411.
- Sugawara, T., Matsubara, K., Akagi, R., Mori, M. and Hirata, T. (2006) Antiangiogenic activity of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9805-9810.
- Sugiura, Y., Kinoshita, Y., Abe, M., Murase, N., Tanaka, R., Matsushita, T., Usui, M., Hanaoka, K. I. and Miyata, M. (2016). Suppressive effects of the diethyl ether fraction from a brown alga *Sargassum fusiforme* on allergic and inflammatory reactions. *Fisheries Science*, 82, 369-377.
- Sugiura, Y., Matsuda, K., Okamoto, T., Yamada, Y., Imai, K., Ito, T., Kakinuma, M. and Amano, H. (2009). The inhibitory effects of components from a brown alga, *Eisenia arborea*, on degranulation of mast cells and eicosanoid synthesis. *Journal of Functional Foods*, 1, 387-393.
- Sugiura, Y., Matsuda, K., Yamada, Y., Nishikawa, M., Shioya, K., Katsuzaki, H., Imai, K. and Amano, H. (2006a). Isolation of a new anti-allergic phlorotannin, phlorofucofuroeckol-B, from an edible brown alga, *Eisenia arborea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 2807-2811.
- Sugiura, Y., Matsuda, K., Yamada, Y., Nishikawa, M., Shioya, K., Katsuzaki, H., Imai, K. and Amano, H. (2007). Anti-allergic phlorotannins from the edible brown alga, *Eisenia arborea*. *Food Science and Technology Research*, 13, 54-60.
- Sugiura, Y., Takeuchi, Y., Kakinuma, M. and Amano, H. (2006b). Inhibitory effects of seaweeds on histamine release from rat basophile leukemia cells (RBL-2H3). *Fisheries Science*, 72, 1286-1291.
- Sugiura, Y., Torii, T., Tanaka, R. and Matsushita, T. (2012). Inhibitory effect of extracts from the brown alga, *Ecklonia stolonifera*, on enzymes responsible for allergic reactions and degranulation in RBL-2H3 Cells. *Food Science and Technology Research*, 18, 467-471.
- Sun, Y., Yang, C. and Tsao, R. (2018). Nomenclature and general classification of antioxidant activity/capacity assays. In R. Apak, E. Capanoglu and F. Shahidi (Eds) *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications* (pp 1-19), John Wiley & Sons Ltd.
- Sun, Z., Peng, X., Liu, J., Fan, K. W., Wang, M. and Chen, F. (2010). Inhibitory effects of microalgal extracts on the formation of advanced glycation endproducts (AGEs). *Food Chemistry*, 120, 261-267.
- Sundaram, I. K., Sarangi, D. D., Sundararajan, V., George, S. and Sheik Mohideen, S. (2018). Poly herbal formulation with anti-elastase and anti-oxidant

- properties for skin anti-aging. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, 1–12.
- Surget, G., Le Lann, K., Delebecq, G., Kervarec, N., Donval, A., Poullaouec, M.-A., Bihannic, I., Poupart, N. and Stiger-Pouvreau, V. (2017). Seasonal phenology and metabolomics of the introduced red macroalga *Gracilaria vermiculophylla*, monitored in the Bay of Brest (France). *Journal of Applied Phycology*, 29, 2651–2666.
- Surget, G., Roberto, V. P., Le Lann, K., Mira, S., Guérard, F., Laizé, V., Poupart, N., Cancela, M. M. and Stiger-Pouvreau, V. (2016). Marine green macroalgae: a source of natural compounds with mineralogenic and antioxidant activities. *Journal of Applied Phycology*, 29, 575–584.
- Surget, G., Stiger-Pouvreau, V., Le Lann, K., Kervarec, N., Couteau, C., Coiffard, L. J. M., Gaillard, F., Cahier, K., Guérard, F. and Poupart, N. (2015). Structural elucidation, *in vitro* antioxidant and photoprotective capacities of a purified polyphenolic-enriched fraction from a saltmarsh plant. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 143, 52–60.
- Surh, Y. J. (2005). Transcriptional regulation of cellular antioxidant defense mechanisms. In Y. J. Surh and L. Packer (Eds) *Oxidative Stress, Inflammation, and Health* (pp. 21–40), CRC Press, Boca Raton, FL.
- Svensson, C. J., Pavia, H. and Toth, G. B. (2007). Do plant density, nutrient availability, and herbivore grazing interact to affect phlorotannin plasticity in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*? *Marine Biology*, 151, 2177–2181.
- Swanson, A. K. and Druehl, L. D. (2002). Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquatic Botany*, 73, 241–253.
- Synytsya, A., Kim, W., Kim, S., Pohl, R., Synytsya, A., Kvasnic, F. and Jana, C. (2010). Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. *Carbohydrate Polymers*, 81, 41–48.
- Taboada, C., Millán, R. and Míguez, I. (2010). Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida*. *Science of Food and Agriculture*, 90, 445–449.
- Takema, Y., Yorimoto, Y., Kawai, M. and Imokawa, G. (1994). Age-related changes in the elastic properties and thickness of human facial skin. *British Journal of Dermatology*, 131, 641–648.
- Tan, J. K. L., Vasey, K. and Fung, K. Y. (2001). Beliefs and perceptions of patients with acne. *Journal of the American Academy of Dermatology* 44, 439–444.
- Tang, L., Zhang, W., Zhao, H. and Chen, Z. (2015). Tyrosinase inhibitor screening in traditional Chinesemedicines by electrophoretically mediated microanalysis. *Journal of Separation Science*, 38, 2887–2892.
- Tanniou, A. (2014) Etude de la production de biomolécules d'intérêt (phlorotannins, pigments, lipides) d'algues brunes modèles par des approches combinées de profilage métabolique et d'écophysiologie. Thèse, Université de Bretagne Occidentale, France.
- Tanniou, A., Serrano Leon, E., Vandanson, L., Ibanez, E., Mendiola, J. A., Cerantola, S., Kervarec, N., La Barre, S., Marchal, L. and Stiger-Pouvreau, V. (2013). Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model. *Talanta*, 104, 44–52.
- Tanniou, A., Vandanson, L., Incera, M., Serrano Leon, E., Husa, V., Le Grand, J., Nicolas, J.-L., Poupart, N., Kervarec, N., Engelen, A., Walsh, R. Guérard, F., Bourgougnon, N. and Stiger-Pouvreau, V. (2014). Assessment of the spatial variability of phenolic contents and associated bioactivities in the invasive alga *Sargassum muticum* sampled along its European range from Norway to Portugal. *Journal of Applied Phycology*, 26, 1215–1230.
- Targett, N. M. and Arnold, T. M. (1998). Minireview - predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. *Journal of Phycology*, 34, 195–205.
- Targett, N. M., Coen, L. D., Boettcher, A. A. and Tanner, C. E. (1992). Biogeographic comparisons of marine

T

- algal polyphenolics: evidence against a latitudinal trend. *Oecologia*, *89*, 464-470.
- Tasende, M. G. (2000). Fatty acid and sterol composition of gametophytes and sporophytes of *Chondrus crispus* (Gigartinales, Rhodophyta). *Scientia Marina*, *64*, 421-426.
- Tibbetts, S. M., Milley, J. E., and Lall, S. P. (2015). Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, *27*, 1109-1119.
- Tierney, M. S., Smyth, T. J., Hayes, M., Soler-Vila, A., Croft, A. and Brunton, N. (2013b). Influence of pressurised liquid extraction and solid-liquid extraction methods on the phenolic content and antioxidant activities of Irish macroalgae. *International Journal of Food Science and Technology*, *48*, 860-869.
- Tierney, M. S., Smyth, T. J., Rai, D. K., Soler-Vila, A., Croft, A. K. and Brunton, N. (2013c). Enrichment of polyphenol contents and antioxidant activities of Irish brown macroalgae using food-friendly techniques based on polarity and molecular size. *Food Chemistry*, *139*, 753-761.
- Tierney, M. S., Soler-Vila, A., Croft, A. K. and Hayes, M. (2013a). Antioxidant activity of the brown macroalgae *Fucus spiralis* Linnaeus harvested from the west coast of Ireland. *Current Research Journal of Biological Sciences*, *5*, 81-90
- Tierney, M. S., Soler-Vila, A., Rai, D. K., Croft, A. K., Brunton, N. P. and Smyth, T. J. (2014). UPLC-MS profiling of low molecular weight phlorotannin polymers in *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata* and *Fucus spiralis*. *Metabolomics*, *10*(3), 524-535.
- Thomas, J. E. and Foody, J. M. (2007). The pathophysiology of cardiovascular disease in diabetes mellitus and the future of therapy. *Journal of the Cardiometabolic Syndrome*, *2*, 108-113.
- Thomas, N. V. and Kim, S. K. (2011). Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *32*, 325-335.
- Thomas, N. and Kim, S.-K. (2013). Beneficial effects of marine algal compounds in cosmeceuticals. *Marine Drugs*, *11*, 146-164.
- Thompson, G. R. (2004). Management of dyslipidaemia. *Heart*, *90*, 949-955.
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L. and Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *8*, 137-142.
- Tsuji, N., Moriwaki, S., Suzuki, Y., Takema, Y. and Imokawa, G. (2001). The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochemistry and Photobiology*, *74*, 283-290.
- Tüney, I., Çadirci, B. H., Ünal, D. and Sukatar, A. (2006). Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (İzmir, Turkey). *Turkish Journal of Biology*, *30*, 171-175.
- Turner, C. and Waldebäck, M. (2010) Principles of pressurized fluid extraction and environmental, food and agricultural applications. In S.H. Rizvi (Eds.), *Separation, Extraction and Concentration in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries*. Food Science (pp. 39-70), Technology and Nutrition, WoodHead Publishing Series.

V

- Vandanjon, L., Hersant, C., Tanniou, A., Guérard, F. and Stiger-Pouvreau, V. (2017). Comparison of different membrane filtration systems for recovering active phenolic compounds from the European spread macroalga *Sargassum muticum*. *Journal of Marine Biology and Aquaculture*, *3*, 1-7.
- Vandanjon, L., Vallet, L., Le Glatin, T., Deleris, P., Baron, R., Bourseau, P. and Dumay, J. (2016). Valorization of the macroalgae *Sargassum muticum* by enzymatic hydrolysis, interest of surfactants to improve the extraction of phlorotannins and polysaccharides. *Journal of Marine Biology and Aquaculture*, *2*, 1-7.
- Vaseghi, G., Sharifi, M., Dana, N., Ghasemi, A., and Yegdaneh, A. (2018). Cytotoxicity of *Sargassum*

- angustifolium* Partitions against breast and cervical cancer cell lines. *Advanced Biomedical Research*, 7, 1-6.
- Vissers, A. M., Caligiani, A. and Sforza, S. (2017). Phlorotannin composition of *Laminaria digitata*. *Phytochemical Analysis*, 28, 487-495.
- Vishchuk, O. S., Ermakova, S. P. and Zvyagintseva, T. N. (2011). Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity. *Carbohydrate Research*, 346, 2769–2776.
- Vo Dinh, T., Saravana, P. S., Woo, H. C. and Chun, B. S. (2018). Ionic liquid-assisted subcritical water enhances the extraction of phenolics from brown seaweed and its antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, 196, 287-299.
- Voisin, M. (2007) Les processus d'invasions biologiques en milieu côtier marin : le cas de l'algue brune *Undaria pinnatifida*, cultivée et introduite à l'échelle mondiale. Ecosystèmes. Thèse Paris 6.
- Vonthron-Sénécheau, C., Kaiser, M., Devambe, I., Vastel, A., Musio, I and Rusig, A.-M. (2011) Antiprotozoal activities of organic extracts from French marine seaweeds. *Marine Drugs*, 9, 922-933.
- Wan, T. W., Bahruddin, S. and Boey, P. L. (2009). Determination of TOTOX value in palm oleins using a FI-potentiometric analyzer. *Food Chemistry*, 113, 285-290.
- Wang, H. M. D., Chen, C. C., Huynh, P. and Chang, J. S. (2015). Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource Technology*, 184, 355–362.
- Wang, H. M. D., Li, X. C., Lee, D. J. and Chang, J. S. (2017). Potential biomedical applications of marine algae. *Bioresource Technology*, 244, 1407-1415.
- Wang, J., Jin, W., Hou, Y., Niu, X., Zhang, H. and Zhang, Q. (2013). Chemical composition and moisture-absorption/retention ability of polysaccharides extracted from five algae. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 26–29.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H. G., Hreggvidsson, G. O., Jónsson, J. Ó., Thorkelsson, G. and Ólafsdóttir, G. (2010). Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1387-1393.
- Wang, T., Jónsdóttir, R. and Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116, 240–248.
- Wang, W., Okada, Y., Shi, H., Wang, Y. and Okuyama, T. (2005). Structures and aldose reductase inhibitory effects of bromophenols from the red alga *Symphocladia latiuscula*. *Journal of Natural Products*, 68, 620-622.
- Waterman, P. G. and Mole, S. (1994). Methods in ecology: analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications: Oxford.
- Watson, R. R. and Schönlaui, F. (2015). Nutraceutical and antioxidant effects of a delphinidin-rich maqui berry extract Delphinol®: a review. *Minerva Cardioangiol*, 63, 1-12.
- Wauquier, F., Leotoing, L., Coxam, V., Guicheux, J. and Wittrant, Y. (2009). Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 15, 468-477.
- Whitfield, F. B., Helidoniotis, F., Shaw, K. J. and Svoronos, D. (1999). Distribution of bromophenols in species of marine algae from eastern Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2367-2373.
- Wiemer, D. F., Idler, D. D. and Fenical, W. (1991). Vidalols A and B, new anti-inflammatory bromophenols from the Caribbean marine red alga *Vidalia obtusiloba*. *Experientia*, 47, 851-853.
- Wijesinghe, W. A. J. P. and Jeon, Y. J. (2011). Biological activities and potential cosmeceutical applications of bioactive components from brown seaweeds: A review. *Phytochemistry Reviews*, 10, 431-443.
- Wijesinghe, W. A. J. P. and Jeon, Y. J. (2012a). Exploiting biological activities of brown seaweed *Ecklonia cava* for potential industrial applications: a review.

International Journal of Food Sciences and Nutrition, 63, 225-235.

Wijesinghe, W. A. J. P. and Jeon, Y. J. (2012b). Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review. *Fitoterapia*, 83, 6-12.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes. *Diabetes Care*, 27, 1047-1053.

Wittmann, A.-L. (2015) L'application concrète du Protocole de Nagoya pour les industriels de la cosmétique. Rencontres réglementaires COSMED. Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie.

Wong, K., & Cheung, P. C. (2001). Influence of drying treatment on three *Sargassum* species 2. Protein extractability, in vitro protein digestibility and amino acid profile of protein concentrates. *Journal of Applied Phycology*, 13, 51–58.

Woo, J.-T., Yonezawa, T. and Nagai, K. (2010). Phytochemicals that stimulate osteoblastic differentiation and bone formation. *Journal of Oral Biosciences*, 52, 15-21.

Woolner, V. H., Gordon, R. M. A., Miller, J. H., Lein, M., Northcote, P. T. and Keyzers, R. A. (2018). Halogenated meroditerpenoids from a south pacific collection of the red alga *Callophycus serratus*. *Journal of Natural Products*, 81, 2446-2454.

World Health Organization, & International Society of Hypertension Writing Group. (2003). 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *Journal of Hypertension*, 21, 1983-1992.

X

Xu, X., Yang, H., Khalil, Z. G., Yin, L., Xiao, X., Salim, A. A., Song, F. and Capon, R. J. (2019). Bromocatechol conjugates from a Chinese marine red alga, *Symphyclocladia latiuscula*. *Phytochemistry*, 158, 20-25.

Xu, X., Yin, L., Gao, J., Gao, L. and Song, F. (2014). Antifungal bromophenols from marine red algae *Symphyclocladia latiuscula*. *Chemistry and biodiversity*, 11, 807-811.

Y

Yamaguchi, M. (2013). Marine alga *Sargassum horneri* component and bone homeostasis: role in osteoporosis prevention. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*, 2, 9-14.

Yangthong, M., Hutadilok-Towatana, N. and Phromkunthong, W. (2009). Antioxidant activities of four edible seaweeds from the Southern coast of Thailand. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64, 218–223.

Yates, J.L. and Peckol P. (1993) Effects of nutrient availability and herbivory on polyphenolics in the seaweed *Fucus vesiculosus*. *Ecology*, 74, 1757–1766

Yeo, M., Jung, W.-K. and Kim, G. (2012). Fabrication, characterisation and biological activity of phlorotannin-conjugated PCL/β-TCP composite scaffolds for bone tissue regeneration. *Journal of Materials Chemistry*, 22, 3568.

Yoo, M., Shin, J., Choi, H., Cho, Y., Bang, M., Baek, N. and Lee, K. (2012). Fucosterol isolated from *Undaria pinnatifida* inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines via the inactivation of nuclear factor- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase. *Food Chemistry*, 135, 967–975.

Yoon, N. Y., Eom, T. K., Kim, M. M. and Kim, S. K. (2009). Inhibitory effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on mushroom tyrosinase activity and melanin formation in mouse B16F10 melanoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4124-4129.

Yoon, W.-J., Kim, K.-N., Heo, S.-J., Han, S.-C., Kim, J., Ko, Y.-J., Kang, H.-K. and Yoo, E.-S. (2013). Sargachromanol G inhibits osteoclastogenesis by suppressing the activation NF- κ B and MAPKs in RANKL-induced RAW 264.7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434, 892-897.

- Yoshie, Y., Wang, W., Hsieh, Y. P. and Suzuki, T. (2002). Compositional difference of phenolic compounds between two seaweeds, *Halimeda* spp. *Journal of Tokyo University of Fisheries*, *88*, 21-24.
- Yoshie-Stark, Y., Hsieh, Y-P. and Suzuki, T. (2003). Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. *Journal of Tokyo University of Fisheries*, *89*, 1-6.
- Young, G., Nippgen, F., Titterbrandt, S. and Cooney, M. J. (2010). Lipid extraction from biomass using co-solvent mixtures of ionic liquids and polar covalent molecules. *Separation and Purification Technology*, *72*, 118-121.
- Yuan, Y., Zhang, J., Fan, J., Clark, J., Shen, P., Li, Y. and Zhang, C. (2018). Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four economic brown macroalgae species and evaluation of their antioxidant activities and inhibitory effects on α -amylase, α -glucosidase, pancreatic lipase and tyrosinase. *Food Research International*, *113*, 288-297.
- Yuan, Y. V., Carrington, M. F. and Walsh, N. A. (2005). Extracts from dulse (*Palmaria palmata*) are effective antioxidants and inhibitors of cell proliferation in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, *43*, 1073-1081.
- Yuan, Y. and Macquarrie, D. (2015). Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers*, *129*, 101-107.
- ## Z
- Zaidi, K. U., Ali, A. S. and Ali, S. A. (2014). Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom. *Enzyme Research*, 1-6.
- Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis, D. A. and Barrow, C. J. (2006). A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, *18*, 445-450.
- Zhang, R., Yuen, A. K. L., Magnusson, M., Wright, J. T., De Nys, R., Masters, A. F. and Maschmeyer, T. (2018). A comparative assessment of the activity and structure of phlorotannins from the brown seaweed *Carpophyllum flexuosum*. *Algal Research*, *29*, 130-141.
- Zhang, W. W., Duan, X. J., Huang, H. L., Zhang, Y. and Wang, B. G. (2007). Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyclocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). *Journal of Applied Phycology*, *19*, 97-108.
- Zhao, J., Fan, X., Wang, S., Li, S., Shang, S., Yang, Y., Xu, N., Lü, Y. and Shi, J. (2004). Bromophenol derivatives from the red alga *Rhodomela confervoides*. *Journal of Natural Products*, *67*, 1032-1035.
- Zhou, J., Tang, Q., Wu, T. and Cheng, Z. (2016). Improved TLC Bioautographic assay for qualitative and quantitative estimation of tyrosinase inhibitors in natural products. *Phytochemical Analysis*, *28*, 115-124.
- Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F. and Saboury, A. A. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *34*, 279-309.
- Zubia, M., Fabre, M. S., Kerjean, V., Le Lann, K., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M. and Deslandes, E. (2009). Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chemistry*, *116*, 693-701.
- Zubia, M., Robledo, D. and Freile-Pelegrin, Y. (2007). Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology*, *19*, 449-458.



Annexe

Annexe 1

The stressful life of red and brown seaweeds on the temperate intertidal zone: impact of abiotic and biotic parameters on the physiology of macroalgae and variability of the content of particular metabolites.

Fanny Lalegerie*✉, Leslie Gager*, Valérie Stiger-Pouvreau, Solène Connan

Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, F-29280 Plouzane, France.

* Fanny Lalegerie and Leslie Gager contributed equally to this work.

Abstract

Most marine macroalgae live attached to a substrate in coastal areas characterized by a very variable environment mainly due to the tide cycle which is more or less important depending on the geographical situation. Macroalgae spread over coastal zones according to their resistance to several abiotic and biotic factors. Some species are thus present on intertidal zones and are outside the water for a more or less long time each day; on the other hand, others are always underwater if they are living in the subtidal zone or in pools in which abiotic parameters can be strongly modified during a tide cycle. During these alternating immersion / emersion phases, macroalgae deal then with important modifications of many abiotic parameters, such as light, temperature, salinity, and biotic parameters, such as grazing, fouling, pathogens. To counteract these important variations, intertidal macroalgae develop resistance mechanisms such as the synthesis of special compounds, like photoprotectors, osmolytes, antifouling molecules as examples. In this chapter, after a presentation of the main

environmental parameters facing intertidal seaweeds in temperate environment, some adaptation/protection mechanisms of these algae are presented, with an emphasis on brown (structural species whose biomass is very high on intertidal zones) and red seaweeds (whose diversity is very high).

Keywords

Environmental stresses, macroalgae, metabolism, physiological adaptations, zonation

Distribution of seaweeds on the rocky shore

Marine macroalgae are a highly diverse group estimated at 50,370 species including ~7,300 red (Rhodophyta) and ~2,070 brown macroalgae (Ochrophyta, Phaeophyceae), playing a key role in marine ecosystems (Guiry & Guiry, 2019). Indeed, algae are at the base of the ocean food web, and contribute to primary photosynthetic production at a level almost equivalent to that of terrestrial plants (Falkowski & Raven, 2013). Among the different groups, brown macroalgae, *i.e.* Phaeophyceae, are the most easily observed algae on rocky foreshores, including Fucales and Laminariales (Lüning, 1990). Red macroalgae, *i.e.*

Rhodophyceae, constitute a second group with a greatest specific diversity (Krause-Jensen & Duarte, 2016; Stengel, Connan, & Popper, 2011).

Although some species such as the red macroalga *Gracilaria vermiculophylla* live on sandy or muddy substrate (Surget et al., 2017), benthic macroalgae grow mainly on the rocky shore, and are thus directly subjected to changing environmental conditions (Lüning, 1990). By consequences, algal diversity and abundance is not the same everywhere in the ocean, and more particularly in polar, temperate, and tropical regions (Bolton, 1994; Hurd, Harrison, Bischof, & Lobban, 2014). On temperate rocky shores, macroalgae are affected daily by the tidal cycle and have to deal with a whole range of stresses whose contribution varies at the different tidal levels (Fig. 1). One consequence of the alternation of emersion/immersion periods is the appearance of a vertical distribution (Lüning, 1990), which is supposed to be linked upwards to the resistance of the species to desiccation; but other various potentially stresses including hydrodynamism, high light intensity, elevated temperature, nutrient limitation and osmotic stress resulting from emersion, also have a significant impact (Bird, Franklin, Smith, & Toonen, 2013; Contreras-Porcia, López-Cristoffanini, Meynard, & Kumar, 2017). Thus, rocky shores are divided into several levels described by Lüning (1990), in which algae will be affected by emersion for a

more or less long period (Fig. 1). First of all, the supralittoral level is the highest area of the foreshore with a dominance of lichens and halophytes but no seaweed. The mediolittoral level is the area where the physico-chemical conditions are the most variable because it is subjected to daily emersion/immersion cycle with a tidal range up to 15 m. This level is divided into several distinct zones parallel to the shoreline at different shore heights, defined by the presence of particular species of brown seaweeds (belts) according to their resistance to different stresses (Ar Gall & Le Duff, 2014). Thus, on the upper mediolittoral zone, most macroalgae, such as *Pelvetia canaliculata*, present a lower density and size than lower foreshore species to withstand long desiccation. At the mid- mediolittoral level, there is the *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus* belt on sheltered sites with a disappearance of the first species on exposed sites (Lüning, 1990). On the lower mediolittoral, there are the *Fucus serratus* belt and the *Himanthalia elongata* community, where the effects of the tide are less noticeable. Finally, at the bottom of the rocky shore, there is the subtidal level which is always submerged except in the event of very high tides. At this level, the light for photosynthesis is more limited and some species require near-permanent immersion, including *Laminaria* species.

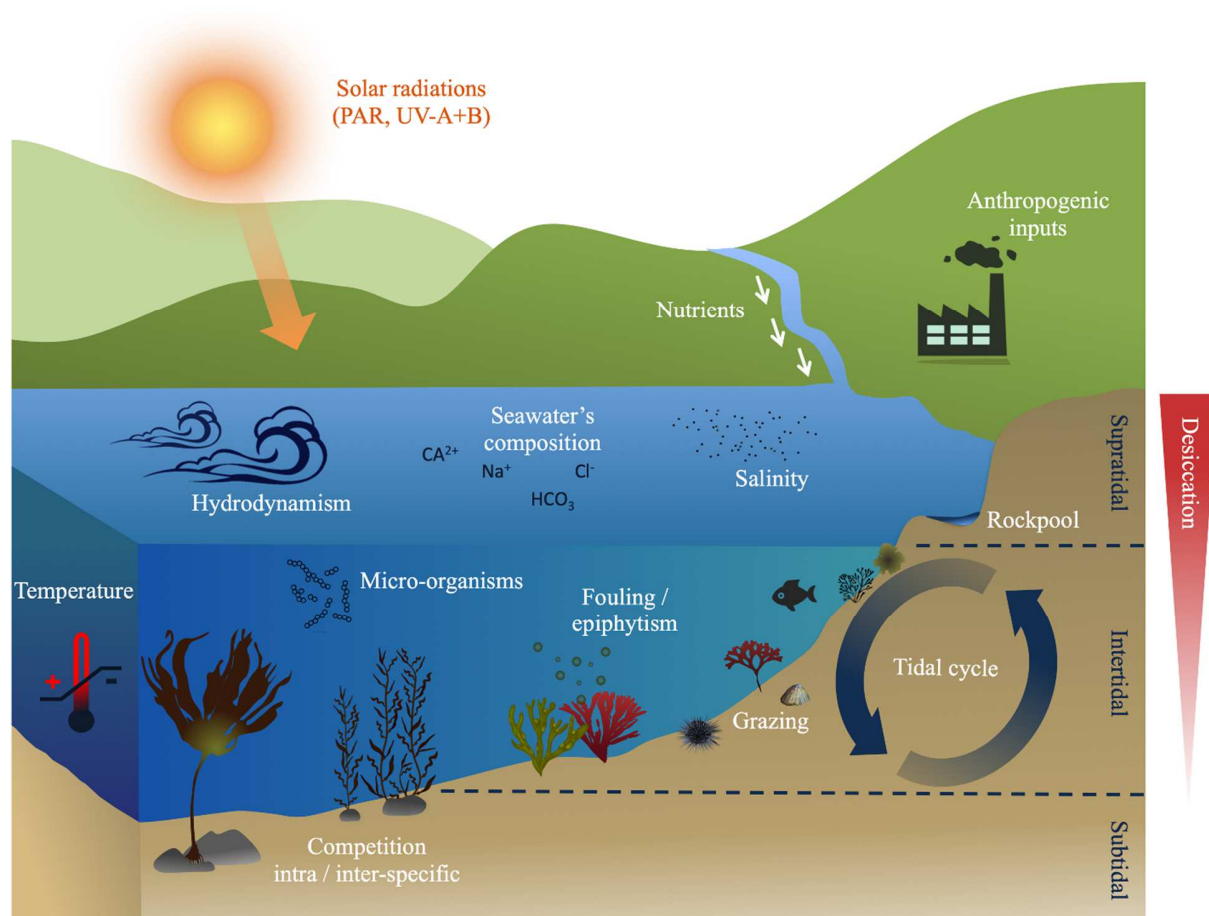


Figure 1 : Conceptual representation of the main abiotic and biotic factors presented in this review, influencing the ecology and physiology of seaweeds living on the rocky shore and along the vertical zonation.

Within this intertidal zone, seaweeds are subjected to a range of abiotic factors which can fluctuate during the day (tide/photoperiod), or with weather and seasons. Rocky foreshores are notably characterized by their wave exposure mode (*i.e.* hydrodynamism): sheltered, semi-sheltered, as opposed to exposed mode where wave intensity is much more noticeable. Communities are therefore different between shores, but there are also difference within each shore where species are positioned more or less high depending on their resistance to different environmental parameters. As already

mentioned, desiccation is the factor that influences mostly the vertical distribution of algae. Nevertheless, the impact of this factor is difficult to assess because it occurs at the same time as other stresses occurring during emersion. Desiccation is notably often associated with variation in salinity. In the marine environment, the salinity of the water is around 35. However, this value can fluctuate, with for example a decrease in salinity in rockpools during rain periods, or increase during evaporation at low tide. As algae are photosynthetic organisms, the presence of light (quality and quantity),

combined with sufficient nutrient level, is also an essential condition for their survival. Nevertheless, too much light and UV-radiations, combined with an increase in temperature, can be harmful. Finally, in addition to these abiotic stresses, macroalgae are subjected to biotic interactions such as competition (for light, space and available substrate), grazing and the presence of epiphytic bacteria, fungi, animals and algae. Among the great diversity of algae, some species are able to withstand extreme conditions, such as in rockpools on the intertidal zone, estuaries or salt marshes, where algae experience severe variable salinity, temperature and nutrient supply conditions (Lüning, 1990).

To cope with their complex and highly variable environment, algae must constantly adapt, and this adaptation is now faster as the various environmental factors tend to change more rapidly due to the global change that currently weakens coastal ecosystems. Thus, to protect and adapt themselves against these abiotic and biotic stresses, macroalgae produce a wide range of metabolites in order to ensure effective photosynthesis, respiration, growth or reproduction (Stengel et al., 2011). This includes photosynthetic, photoprotective, osmoregulatory, antioxidant, antifouling or particular compounds, which can be synthesized in response to different stresses, that can act separately or in synergy. In this context, the aim of this present chapter is to review the impact of

the different abiotic and biotic factors on the physiology of brown and red macroalgae. For this purpose, each parameter will be detailed one by one, presenting which kind of compounds is synthesized and under which circumstances.

Impact of abiotic parameters

Hydrodynamism

Hydrodynamism refers to water motions, due to the tidal cycle, and to waves or ocean currents resulting from winds and differences in the densities of water masses (Hurd et al., 2014). This factor influences the distribution and the vertical zonation of algae on the shore (Fig. 1), because: (1) currents and waves affect other environmental factors as light penetration, temperature, and the availability of nutrients and all elements necessary for algal development; (2) hydrodynamism influences the distribution of fauna, indirectly affecting algae through spatial competition and potential impact of herbivores; (3) moreover, to survive on exposed sites, macroalgae must be resistant enough to remain attached to their substrate and withstand wave action, giving rise in interesting adaptations which will be developed below (Lüning, 1990; Hurd, 2000). Resulting from hydrodynamism, macroalgal species are often acclimatized to a type of wave exposure, either sheltered (low hydrodynamism), exposed (high hydrodynamism) or the intermediate, semi-exposed environment.

Hydrodynamism can affect the growth, the morphology or the phenological plasticity of seaweeds. In this sense, Kraemer and Chapman (1991) showed that juveniles of the brown alga *Egregia menziesii* grown under high hydrodynamic conditions were about 2-times stronger and stiffer than those grown under low hydrodynamic conditions to resist hydrodynamism and not being swept away by waves and tide. In addition, seaweeds can adapt their size, shape and direction to thrive/disperse with the flow and increase their resistance to currents (Boller & Carrington, 2006). Thus, it has been shown that the red alga *Chondrus crispus* can realign its stipe and compact its thallus in response to the flow (Boller & Carrington, 2006). Moreover, nutrient uptake by macroalgae is influenced by water motion, impacting growth and photosynthesis (Gerard, 1982; Hurd, 2000). Indeed, with a high current, the nutrient absorption rate increases due to the decrease in the thickness of the diffusion boundary layer, and the acceleration of transport through it (Lüning, 1990). Thus, photosynthesis increases with hydrodynamism until enzyme saturation, as demonstrated in *Macrocystis pyrifera* (Wheeler, 1980). In return, algae in low hydrodynamic habitats tend to have a high surface-to-volume ratio, which maximizes nutrient and gas absorption (Stewart & Carpenter, 2003).

The reproduction can also be influenced by hydrodynamism. According to Gordon and

Brawley (2004), water motion mainly affect gametes and spores release, and their dispersal distance. Thus, they have demonstrated an increase in the zoospores release of *Alaria esculenta* under shaken conditions, and that on the contrary, there were more gametes released by the atheridians under calm conditions.

The presence of some molecules in seaweeds could be influenced by hydrodynamism, especially polysaccharides in Phaeophyceae. In this sense, Craigie, Morris, Rees, and Thom (1984) found that the alginic acid composition in *Saccharina longicuris* was related to the degree of wave exposure, although this hypothesis is controversial (Kraemer & Chapman, 1991). Moreover, Le Lann, Rumin, Cérantola, Culioli, and Stiger-Pouvreau (2014) showed that the brown alga *Bifurcaria bifurcata*, living in a semi-sheltered/sheltered environment, synthesized more terpenes, including bifurcanone which is specific to sheltered environment. According to Rönnerberg and Ruokolahti (1986), phenolic content of *Fucus vesiculosus* have been shown to depend on the degree of wave exposure of the habitat with smaller fluctuations of phenolic content at exposed site compared to sheltered site, as also demonstrated in *Sargassum muticum* by Plouguerné et al. (2006b). It is sometimes difficult to interpret the significance of the difference in composition or morphology with the exposure mode, as many other factors can

interact, including desiccation and herbivory. In this sense, Kraemer and Chapman (1991) did not find a variation in alginic acid content in the Laminariales *Egregia menziesii* exposed to different wave velocities; and Fuller and Mathieson (1972) showed no significant difference in carrageenan content of the red macroalga *Chondrus crispus* according to the wave exposure.

Desiccation

In the intertidal zone, seaweeds as being sessile organisms living attached to the substrate, are faced with desiccation for a brief or longer period depending on the position on the shore, due to the tide and the alternation of immersion and emersion. Several preliminary studies agree that the ability of algae to withstand significant water loss and mostly to rehydrate quickly defines their tolerance to drought, and not their ability to retain water (Contreras-Porcia et al., 2017). Thus, the different algal species display different desiccation tolerance, with the most resistant species at the top of the intertidal zone (Abe, Kurashima, Yokohama, & Tanaka, 2001; Lüning, 1990). Thanks to a slower water loss, a faster rehydration and a greater resistance to high water losses, macroalgae of the upper intertidal zone can lose up to 90% of their cellular water content (Contreras-Porcia et al., 2017). This rate can reach up to 96% for the red macroalga *Pyropia orbicularis* or *P. columbina*, making these species models to study algal responses to

desiccation (Contreras-Porcia, Thomas, Flores, & Correa, 2011; Fierro et al., 2017). Nevertheless, a whole range of factors can influence the rate of desiccation of each species, as for example weather and seasons, as high temperatures and wind favour a high rate of water evaporation (Lamote, Johnson, & Lemoine, 2012). Desiccation also seems to be related to the exposure mode, with the most exposed species being more likely to have a lower rate of desiccation due to thicker cell walls (Kristensen, 1968).

The loss of water induced by desiccation causes morphological changes such as retraction of protoplasts and chloroplasts disorganization due to an osmotic imbalance (Flores-Molina et al., 2014). To avoid these effects, some algae regularly subjected to emersion present a small specific surface to reduce desiccation, as species with a lower surface/volume ratio lose their water content less quickly (Lüning, 1990). In this way, macroalgae in the upper intertidal zone are smaller in size to better resist to water deprivation as demonstrated for the brown macroalga *Fucus spiralis* (Schagerl & Möstl, 2011). The formation of mucilage on the surface of some particular algae is another way that has been suggested for resistance to desiccation (Bérard-Therriault & Cardinal, 1973). Indeed, the cell wall of macroalgae is composed of some unique polysaccharides (or phycocolloids), with a strong polyanionic character and which possess water retention properties, especially due to

sulfatation. The main phycocolloids are fucoidans and alginates in brown seaweeds (Bérard-Therriault & Cardinal, 1973), whereas red seaweeds contain agars, xylans and carrageenans (Kloareg & Quatrano, 1988; reviewed by Stiger-Pouvreau, Bourgougnon, & Deslandes, 2016). Contrary to freshwater algae and terrestrial plants, polysaccharide of marine macroalgae are highly sulfated, up to 20-38% for carrageenans, which could be a specific adaptation to marine environment and desiccation (Kloareg & Quatrano, 1988).

From a physiological point of view, it has been shown that there is a decrease in photosynthesis and chlorophyll-*a* content during emersion (Contreras-Porcia et al., 2011; Flores-Molina et al., 2014; Gao & Wang, 2012). In this sense, López-Cristoffanini et al. (2015) demonstrated in the red macroalga *Pyropia orbicularis* that a drying treatment could impact the expression of proteins involved in photosynthesis. The cyclic electron flow around photosystem I has been demonstrated to play a significant role in response to drought, by protecting the photosynthetic apparatus and modulating a pH gradient for the synthesis of ATP (Gao & Wang, 2012). Photosynthesis is then completely restored in emersed algae, except if a critical water content has not been reached (Dring & Brown, 1982; Lamote et al., 2012).

In general, prolonged desiccation periods can affect a whole set of physiological activities due

to the fact that being out of the water starves algae of nutrients and inorganic carbon (Lamote et al., 2012). For example, desiccation causes a decrease in phosphate absorption in the brown species *Fucus spiralis*, *Ascophyllum nodosum* and *Fucus serratus* (Hurd & Dring, 1991). Macroalgae experiencing periodical emersion may benefit from increasing atmospheric CO₂ concentrations or light (Zou & Gao, 2002), which may explain why the rate of photosynthesis during emersion can sometimes exceed the one during immersion. In addition, a long period of desiccation induces oxidative stress with an oversupply of reactive oxygen species (ROS) (Contreras-Porcia et al., 2011; Sampath-Wiley, Neefus, & Jahnke, 2008). For example, concentrations of H₂O₂ increased up to 25 fold in cortical cells of the brown macroalga *Lessonia spicata* during desiccation (Flores-Molina et al., 2014). Molecular analysis seems to demonstrated that some genes, such as those encoding the enzymes trehalose phosphate synthase (TPS) or catalase (CAT) which protect algae from oxidative stress, are overexpressed in the red alga *Pyropia orbicularis* during desiccation (Fierro et al., 2017). As for higher plants, the enzyme glutathione reductase (Contreras-Porcia et al., 2017; Sampath-Wiley et al., 2008), and the hormone abscisic acid (ABA) (Guajardo, Correa, & Contreras-Porcia, 2016) regulate oxidative stress under water deficiency in algae.

One challenge in measuring the effect of desiccation is that it occurs naturally during periods of emersion, and is thus associated with other stresses like changes in light or temperature (Matta & Chapman, 1995; Sampath-Wiley et al., 2008), which can accelerate desiccation (Binet, 1956). In particular, it has been demonstrated in the Gigartinales *Endocladia muricata* that desiccation leads to better thermotolerance, protecting the alga from high heat during low tide (Hunt & Denny, 2008). Similarly, according to Ji et al. (2014) and López-Cristoffanini et al. (2015), heat shock proteins expression is altered during desiccation, due to high temperature.

Light

As algae are photosynthetic organisms, light is a key factor for their growth and distribution. More particularly, algae need to absorb enough photosynthetically active radiation (PAR) in their thylakoids to transform light energy into chemical energy through photosynthesis, necessary for their development. In this sense, the growth of red macroalgae such as *Gracilaria domingensis* (Ramlov et al., 2011), *Chondrus crispus* and *Palmaria palmata* (Manríquez-Hernández, Duston, & Garbary, 2016) have been enhanced under high photon flux intensity, indicating that light can be a limiting factor. There is a photosynthetic light compensation point, which corresponds to the photon fluence rate for which the amount of oxygen produced

by photosynthesis accurately compensates for the oxygen absorption related to respiration (Hurd et al., 2014; Lüning, 1990). On the other hand, if the light increases well beyond the compensation point, the light saturation can be reached and photosynthesis is thus maximum (P_{max}). At this point, the enzymatic reactions limit the photosynthesis. And if the light increased again, photosynthesis is then reduced (photoinhibition).

To achieve photosynthesis, all algal species have chlorophyll-*a* in their chloroplasts to capture light photon. Depending on the group of algae, there are also other chlorophylls that absorb light energy at other wavelengths (Table 1). In addition, the different groups of seaweeds are characterized by their carotenoid composition including fucoxanthin, violaxanthin, antheraxanthin, lutein, zeaxanthin, α -carotene, and β -carotene (Lüning, 1990) (Table 1). The composition and quantities of carotenoids also varied widely between algal species, although no link has ever been demonstrated with phylogeny (Schubert, Garcia-Mendoza, & Pacheco-Ruiz, 2006). In red seaweeds, lutein is the most common carotenoid and can represent up to 99% of the total carotenoid content (Lalegerie et al., 2019; Schubert et al., 2006). In order to optimize photosynthesis in the presence of low light intensity, red algae also possess extra pigments called phycobiliproteins (*i.e.* phycocyanin, phycoerythrin and allophycocyanin

at the phycobilisome level) (Dumay, Morançais, Munier, Le Guillard, & Fleurence, 2014).

Table 1. Pigments composition and presence of phenolic compounds or mycosporine-like amino acids (MAAs) within the red and brown macroalgae according to Stengel, Connan & Popper (2011).

Group	Chlorophylls	Other pigments	MAAs	Phenolic compounds
Rhodophyta	Chlorophyll- <i>a</i>	phycocyanin, allophycocyanin, α -carotene, violaxanthin, antheraxanthin, lutein	Yes	Few
Phaeophyceae	Chlorophyll- <i>a</i> Chlorophyll- <i>C₁</i> , <i>C₂</i>	β -carotene, fucoxanthin, antheraxanthin, zeaxanthin, neoxanthin	No	Many

Irradiance in the ocean is highly variable, since it depends on weather, algal position on the shore, latitude, water turbidity, seasons and time of the day (day/night and tidal cycles) (Hanelt & Figueroa, 2012; Hurd et al., 2014). However, any modification of the light, whether by the duration of irradiance, the intensity or the nature of the radiations, will have an impact on the physiology and distribution of seaweeds (Hurd et al., 2014). In particular, light is an environmental signal for reproduction and growth, since it has been demonstrated for example that the release and accumulation of gametes is light-induced (especially with the blue radiations) in several species like the brown macroalga *Dictyota dichotoma* (Hanelt & Figueroa, 2012). However, the amount of light first affects photosynthesis and the amount of chlorophyll-*a*. Thus, Torres, Chow, and Santos (2015) observed a 55% increase in chlorophyll-*a* content from 1000 to

60 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in *Gracilaria tenuifrons*, to enhance light energy capture at low irradiance. On the contrary, many studies have shown that chlorophyll-*a* levels are lower under high light, particularly in summer due to the increase irradiance. It has been observed, for example, a 50% decrease in chlorophyll-*a* in the brown alga *Ascophyllum nodosum* during summer (Stengel & Dring, 1998), and a 3-fold decrease from February to July in the red alga *Palmaria palmata* (Guihéneuf, Gietl, & Stengel, 2018). Similarly, chlorophyll-*a* content increases with water depths with light attenuation and fluctuation in the composition of the light spectrum, as shown in *Porphyra umbilicalis* and *Chondrus crispus* (Ramus, Beale, Mauzerale, & Howard, 1976).

Although light is vital for algae, too much radiation, especially in the UV-A and UV-B range, can be harmful, mainly for the early stages of

development (Karentz, 2001; Wiencke et al., 2000). UVR can cause a decrease in growth, as observed in the red seaweeds *Crassiphycus birdiae* (Ayres-Ostrock & Plastino, 2014) and *Kappaphycus alvarezii* (Schmidt, Maraschin, & Bouzon, 2010). Above a certain threshold, extreme irradiances can cause photodamages such as DNA alterations, synthesis of reactive oxygen species (ROS), photo-oxidation, or degradation of photosynthetic pigments (Karentz, 2001; Karsten, 2008; van de Poll, Eggert, Buma, & Breeman, 2001). UV radiation is notably reported to be responsible for damage to chloroplasts, thylakoids and mitochondria in *K. alvarezii* (Schmidt et al., 2010) and *Palmaria palmata* (Holzinger, Lütz, Karsten, & Wiencke, 2004). A very strong visible light can also lead to photoinhibition which consists in the reduction of the photosynthesis, which could be temporary or deleterious if very strong or long lasting (Hanelt & Nultsch, 2003; Franklin, Osmond, & Larkum, 2003). For example, photoinhibition can reach 95% in *Chondrus crispus* (Yakovleva & Titlyanov, 2001). Under UV radiation, this phenomenon of inhibition of photosynthesis may be related to the activity of rubisco and D₁ protein of PSII (Bischoff, Hanelt, & Wiencke, 2000; Schmidt et al., 2010).

In order to protect themselves, algae are able to produce photoprotective compounds that will dissipate excess energy (Bhatia, Sharma, Sharma, & Purohit, 2011; Rastogi, Sinha, Singh, & Häder,

2010). In this sense, carotenoids can play both photosynthetic and photoprotective roles (Hashimoto, Uragami, & Cogdell, 2016; Young & Frank, 1996). In particular, in some seaweeds, they protect the cells against excess light energy in photosystem II and oxidative stress via the xanthophyll cycle (Fig. 2): when the amount of light is too high, violaxanthin is converted by de-epoxidation to antheraxanthin and then zeaxanthin, which reduces excess energy (Karentz, 2001; Ursi, Pedersen, Platino, & Snoeijs, 2003).

Mycosporine-like amino acids (MAAs) are a second group of photoprotective compounds found in red macroalgae (Sinha, Singh, & Häder, 2007), which are reported to be effective against UV radiation (see Chapter 8). Yakovleva and Titlyanov (2001) for example, showed that repeated exposure to UV radiation resulted in the accumulation of MAAs, coupled with less photoinhibition in *Chondrus crispus*. Some red species such as *Furcellaria lumbricalis* or *Heterosiphonia plumosa* are not able to produce MAAs, while others like *Palmaria palmata*, or *Chondrus crispus* have been reported to synthesize up to 7 or 8 MAAs (Lalegerie et al., 2019). Shinorine, palythine and porphyra-334 are the most widely MAAs distributed among red algae.

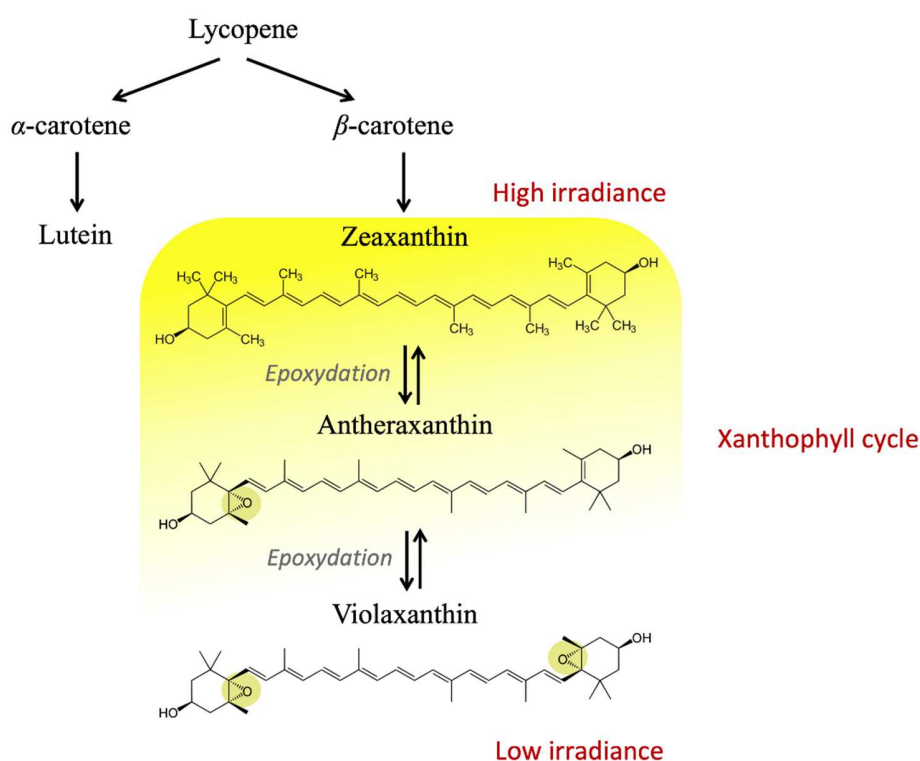


Figure 2 : The xanthophyll cycle in macroalgae according to Latowski, Kuczyńska, and Strzałka (2011), and Takaichi (2011).

Several studies have suggested that MAAs could also be synthesized in response to other environmental stresses and more particularly with respect to nutrient limitation (Oren & Gunde-Cimerman, 2007).

Beyond the well-known photoprotective compounds mentioned above, it has also been demonstrated that phenolic compounds of brown seaweed (phlorotannins) could play a role in the UV-protection (Schoenwaelder, 2002). For example, Pavia, Cervin, Lindgren, and Åberg (1997) have found that a 50% increase in UV radiations during 2 weeks resulted to a 30% increase in phlorotannins concentration of *Ascophyllum nodosum*.

Temperature

Temperature is the major factor controlling survival, growth, reproduction and thus geographical distribution of seaweeds (Yarish, Breeman, & van den Hoeck, 1986). However, in temperate zones, temperature can change according to the latitude, depth, season, but also according to the tide, with emersion and immersion phases. Thus, according to Eggert (2012), seaweeds respond to the temperature in three different ways: genetic adaptation to the constant temperature of the living environment, or phenotypic acclimatization and short-term physiological regulation in response to the temporal temperature shocks. In summer and winter at low tide, the seawater temperature

highly varies, forcing intertidal organisms to be euryceous and highly tolerant to any variation in temperature. Intertidal seaweeds living on the upper shore have thus been found to have temperature tolerance ranges broader than subtidal species, and can tolerate exposure to high temperatures for prolonged time periods (Einav, Breckle, & Beer, 1995). For example, the sublittoral brown macroalgae *Laminaria* spp. can tolerate a temperature up to 20°C, whereas *Fucus spiralis* from upper littoral is resistant up to 28°C (Lüning, 1990). Moreover, the temperature tolerance of seaweed depends on latitude, with southern perennial kelp more resistant to short heat shock than the northern one (Pereira, Engelen, Pearson, Valero, & Serrão, 2015).

The temperature can affect the growth and reproduction, for which optimal temperature and timing must be particularly important (Molenaar & Breeman, 1997). Indeed, growth and reproduction can be under direct photoperiodic control or endogenous circannual rhythm (Lüning & Tom Dieck, 1989). For example, Molenaar and Breeman (1994) showed that the life history of the red alga *Phyllophora pseudoceranoioides* is regulated by temperature and daylength, with the production of spores in winter. In addition, Yarish, Breeman and van den Hoek (1986) showed that gametophytes of *Polyneura bonnemaisonii* (previously *Polyneura hilliae*) have a smaller survival range at low

temperatures than tetrasporophytes, which limits its distribution.

Moreover, the temperature can impact the photosynthesis and the other metabolic pathways of seaweeds, as enzymatic activities are temperature-dependent. In this sense, the response of thermal acclimation of photosynthesis appears to be highly comparable to that described for photoacclimation (Huner, Öquist, & Sarhan, 1998). However temperature and light have been shown to have interactive effects on photosynthesis and its regulation (Savitch, Maxwell, & Huner, 1996). Moreover, temperature sensitivity affects proteins and membranes: quantitatively (concentration changing), qualitatively or through modulation (modify the protein environment) (Eggert, 2012). More particularly, it has been demonstrated that membrane fluidity decreases with a decrease in temperature (Eggert, 2012; Inaba et al., 2003; Szalontai, Nishiyama, Gombos & Murata, 2000). Heat stress affects membrane-associated processes because high temperatures cause fluidization of membranes and finally disintegration of the lipid bilayer (Los & Murata, 2004). In addition, Pakker et al. (2000) demonstrated that the reparation of DNA damages induced by UV-B radiations is dependent on the temperature in *Palmaria palmata*.

The production of metabolite in macroalgae is also temperature dependant. Notably, high

temperature induces the production of heat shock proteins. For example, Ireland et al. (2004) showed an induction of these molecules in *Fucus serratus* exposed to 42°C, maximal after 2 hours. Taniou (2014) studied the impact of water temperature on total phenolic content during 30 days at 11° and 22°C on *Sargassum muticum*: a decrease in phenolic levels was observed at 22°C compared to those grown at 11°C. According to Connan, Deslandes, and Ar Gall (2007), air-temperature correlated significantly with the phenolic content in uppershore *Pelvetia canaliculata* and midshore *Ascophyllum nodosum*, but not for the lowshore *Bifurcaria bifurcata*. Temperature can also influence pigment contents of the algae. Indeed, Rothäusler, Gómez, Karsten, Tala, and Thiel (2011) showed the highest carotenoid levels at the coolest temperature (12°C) compared to ambient (17°C) and warm (20°C) temperatures and independently of irradiances, in *Macrocystis pyrifera* being afloat for 15 days. Vanitha and Chandra (2012) found no correlation between pigments (R-phycoerythrin, R-phycoerythrin, allophycocyanin and chlorophyll *a*) and temperature but some variations appeared maybe due to other factors (light or humidity) in red algae (*Gracilaria corticata*, *Grateloupia lithophila*, *Gelidium* sp. and *Bryocladia thwaistesii*). On the contrary, Kim, Kraemer, Neefus, Chung, and Yarish (2007) showed an influence of temperature on the phycoerythrin content in several *Porphyra* species (*P.*

leucosticta, *P. linearis*, *P. umbilicalis*); with higher contents at low temperatures (10° compared to 15° and 20°C), but not for *P. amplissima*. In a similar manner, Guihéneuf, Gietl, and Stengel (2018) found an increase in chlorophyll *a* and phycobiliprotein concentration in *Chondrus crispus* and *Palmaria palmata* when temperature and irradiance decreased in autumn. Conversely, Ding, Ma, Huang, and Chen (2013) showed an increase in chlorophyll *a* content but this time when water temperature increase from 15 until 25°C in *Hypnea cervicornis*.

Salinity

The ranges of salinity encountered in marine habitats differ greatly with respect to space and time. Salinity is different according to the oceans and seas. More particularly, saltmarshes, estuaries and near-shore waters are environments with extreme salinity variations. In marine waters, intertidal algae are also subjected to variations in salinity according to the season, day, or even hours, as in the rockpools of the intertidal zone. Notably, at low tide seaweeds experienced extreme dilutions by rainwater or, on the contrary, extreme salinities by evaporation. In the intertidal zone, Fucales can withstand variations in salinity ranging from 0.1 to 3.5 times that of seawater, while subtidal algae, like the red macroalgal genera *Antithamnion* or *Plocamium*, are less tolerant, between 0.5 and 1.5 times that of seawater (Zaneveld, 1969). Macroalgae living in

environments with variable salinity must maintain a higher osmotic pressure in their cell medium than in their environment; an osmotic pressure of 2.6 to 3 MPa is typical of seaweeds (Karsten, 2007). Some algal species are euryhaline as they are able to tolerate a large range of salinities, while stenohaline species cannot survive at a salinity too far from their salinity optimum (Bird & McLachlan, 1986). Karsten (2007) demonstrated that the euryhaline *F. distichus* was not affected by a hypo- or hypersaline stresses (salinities ranging from 5 to 60) while *Alaria esculenta*, *Saccharina latissima* and *Laminaria solidungula* demonstrated a strong loss of pigments (bleaching) or even high mortality under hyposaline stresses; intertidal species are thus mostly euryhaline while subtidal are stenohaline. Schubert, Feuerpfeil, Marquardt, Telesh, and Skarlato (2011) showed a decline in abundance of macroalgae with salinity until 7.2. Moreover, Stratil, Neulinger, Knecht, Friedrichs, and Wahl (2014) demonstrated that salinity was important in structuring algal-associated epibacterial communities: they showed a disappearance of epiphytic and epilithic betaproteobacteria with an increase in salinity, from 5 to 25.

Faced to variations in salinity, algae respond to osmotic shock by regulating either their concentrations of ions, such as K^+ , Na^+ , Cl^- or by synthesizing organic osmolytes, *i.e.* molecules with low molecular weight in order to be easily

and rapidly exchange with the surrounding water to equilibrate osmotic pressure with their own tissues (Karsten, 2007). In general, osmolytes are concentrated in algal vacuoles and/or are located in the cytoplasm (Karsten, 2007). The last author drew a schematic functioning of the osmotic adjustment in macroalgae, listing two phases in this phenomenon: a phase I which includes rapid water flows through the cell-wall, entering (hypoosmotic shock) or leaving (hyperosmotic shock) depending on the osmotic shock, and a phase II which represents metabolic control, including at the beginning an ionic regulation which is very rapid, followed by a slow ionic regulation involving osmolytes.

Variations in salinity affect different aspects of macroalgal metabolism, in particular photosynthesis, respiration, ionic fluxes and algal growth, as demonstrated in the brown macroalga *Dictyopteris membranacea* by Gessner (1969), with a photosynthetic optimum at a salinity between 28 and 55. During readjustment to hyperosmotic shock, rapid changes in mineral concentration often precede a slower synthesis of organic osmolytes, such as mannitol in brown algal species (Munda, 1978). Mannitol is the main product resulting from photosynthesis, which accumulates in Phaeophyceae where it represents a significant part of the dry matter of the algae: 23% and 19.5% in the Fucales *Pelvetia canaliculata* and *Halidrys siliquosa*, respectively (Reed, Davison,

Chudek, & Foster, 1985). The accumulation of mannitol and volemitol has been shown in *Pelvetia canaliculata* (Reed et al., 1985) while *Himanthalia elongata* synthesizes mannitol and alatriol (Wright & Reed, 1985). Red algae produce mainly floridoside for their osmoregulation (Reed, 1990). In *Porphyra* spp., different forms of isofloridoside are present simultaneously with floridoside for the osmoregulation of each species (Reed et al., 1980). The average floridoside content varies between 1.5 and 8% of the dry matter of the algae, but can reach 22% in some species (Kirst, 1990). Floridoside is a small carbohydrate synthesized very early in photosynthesis, as demonstrated in the red algae *Solieria chordalis* (Goulard, Diouris, Quéré, Deslandes, & Floc'h, 2001). Simon-Colin, Bessieres, and Deslandes (2002) highlighted the major role of floridoside in the osmoregulation of the red macroalga *Grateloupia turuturu* (formerly *G. doryphora*), demonstrating an increase at high salinity and a decrease under hypohaline stress, and returning at its initial state after 3 days of cultivation of the macroalga.

As a general rule, red algae do not synthesize alditol, *i.e.* non-cyclic polyol, except few Ceramiales, which accumulate mannitol, as *Caloglossa leprieuri*, whose mannitol contributes 23% of the internal osmotic pressure (Karsten et al., 1992a). The red macroalgal *Bostrychia* (previously *Stictosiphonia*) *arbuscula*, use a combination of D-dulcitol and D-sorbitol as

organic osmolytes (Karsten, West, & Zuccarello, 1992b). Some amino acids are also involved in the osmoregulation of some species, generally characterized by low concentrations of basic amino acids and a dominance of alanine, aspartic and glutamic acids that can represent more than 50% of free amino acids (FAA; Fattorusso & Piattelli, 1980). Other amino acids are involved in osmoregulation in red algae: proline (54.8% FFA in *Polysiphonia nigrescens* and 65.3% FFA in *Halopitys incurvus*; Fattorusso & Piattelli, 1980); taurine, a sulphur amino acid derivative, such as *Gracilaria vermiculophylla* (Surget et al., 2017), *Gracilariopsis lemaneiformis* (Broberg, Kenne, & Pedersen, 1998), *Grateloupia* sp. (Impellizzeri et al., 1975) and *Chondrus crispus* (Harnedy & Fitzgerald, 2011). In marine algae, there are also other compatible molecules that are accumulated in response to osmotic stress, such as quaternary ammoniums (betaines) found in some red algae, such as *Mastocarpus stellatus*, *Calliblepharis jubata* and the brown alga *Dilophus fasciola* (Blunden et al., 1992), and dimethylsulfoniopropionate (DMSP), a tertiary sulfonium found in some Rhodophyta, such as *Porphyra*, *Polysiphonia* and in minority in brown algae (Reed, 1983).

Seawater chemical composition

To achieve their photosynthesis and growth, algae need nutrients that are essential to their development. As a result, several experiments have shown that nutrient enrichment leads to

higher growth and nutrient content in tissues, such as in the red macroalga *Gracilaria vermiculophylla* (Abreu, Pereira, Buschmann, Sousa-Pinto, & Yarish, 2011). More particularly, many culture experiments have demonstrated that carbon (C), hydrogen (H), oxygen (O), nitrogen (N), magnesium (Mg), copper (Cu), manganese (Mn), and zinc (Zn) are essential for algae (Hurd et al., 2014). Nitrogen as nitrate (NO_3^-), nitrite (NO_2^-), ammonium (NH_4^+), or urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), and phosphorus as phosphate (H_3PO_4) are often limiting factors for primary production and algal growth in natural environment since they occur at low concentrations in seawater (Lüning, 1990). Some seaweeds could thus produce hyaline hairs under low nutrient conditions to increase nutrient uptake rate (Harrison & Hurd, 2001; Wallentinus, 1984). Different algal species do not have the same affinity for each form of nutrients available in the marine environment: NH_4^+ is taken up more preferentially and quickly by most seaweeds, such as the brown macroalgae *Fucus serratus* (Brenchley, Raven, & Johnston, 1997) and *Pelvetiopsis limitata* (Fujita, Wheeler, & Edwards, 1989) or the red macroalga *Chondrus crispus* (Corey, Kim, Duston, Garbary, & Prithiviraj, 2013). On the other hand, the red seaweed *Palmaria palmata* showed similar affinity for NH_4^+ and NO_3^- (Martínez & Rico, 2004).

Seaweed physiology depends on environmental nutrients, whose concentrations are very variable in the marine environment: concentration of dissolved nutrients in surface waters are generally important in high latitudes, in coastal upwelling zones (Levitus, Conkright, Reid, Najjar, & Mantyla, 1993), and generally close to the coastlines and in estuaries or eutrophic sites. In addition, the availability of nutrients can vary greatly depending on the time of the day or year. Indeed nutrient inputs are dependant of tidal cycle, since algae have no longer nitrogen source during emersion affecting thus the nutrient seaweed content. For example, in the red macroalga *Porphyra umbilicalis*, the N content in tissues decreased during emersion (Kim, Kraemer, & Yarish, 2013). More specifically, species living at the upper part of the intertidal zone need to be adapted to a longer nutrient deficiency, by modifying their uptake rate, uptake efficiency or enzymatic activities (Phillips & Hurd, 2003). In this sense, Benes and Bracken (2016) have demonstrated that the absorption rate of the brown seaweed *Fucus vesiculosus* is 18% higher in the upper intertidal thalli. In addition, algae are subjected to seasonal fluctuations in the nutrient content in the seawater. Macroalgae are particularly affected by very low ambient N and P concentrations during summer (Fujita et al., 1989). To cope with these variations, some species adapt their nutrient uptake/efficient, such as the brown alga *Fucus gardneri* whose nitrate reductase activity

increased 7-fold between February and March (Hurd, Berges, Osborne, & Harrison, 1995). Similarly, relative preferences for each N source vary according to the time of year in *Bostrychia arbuscula*, *Scytothamnus australis* and *Xiphophora gladiata*: in winter NH_4^+ is preferred over NO_3^- and urea, while in summer NH_4^+ and NO_3^- are equally absorbed (Phillips & Hurd, 2003). In addition, nutrient concentrations depend on several abiotic factors: it has been shown that nutrient uptake depends on water motion (*i.e.* hydrodynamism), since it decreases the size of the water boundary layer of the seaweed (Hurd, 2000); the absorption of nutrients depends also on light.

To cope with the temporal variation of nutrients, some species have the ability to incorporate and store more or less important quantities of nutrients in their cells, for a longer or shorter time in N-rich molecules such as proteins, amino acids and pigments (Gagné, Mann, & Chapman, 1982). According to Naldi and Wheeler (1999), proteins can contribute up to 90% to total N storage in algae. In *Palmaria palmata*, phycoerythrin N represents up to 8.3% of the total thallus N content (Martínez & Rico, 2002). Levels of these compounds increase with N concentration and are quickly degraded under N limitation, as demonstrated in the red seaweed *Porphyra* sp. (Korbee, Huovinen, Figueroa, Aguilera, & Karsten, 2005; Pereira, Kraemer, Yarish, & Sousa-Pinto, 2008). Recently,

mycosporine-like amino acids have been also suggested as a N source for *Palmaria palmata* in summer (Guihéneuf, Gietl, & Stengel, 2018). As a result, algal growth is not directly related to nutrient concentrations in the surrounding environment. Thus, to ensure their reproduction during summer, some species store nutrients in winter, when nutrients are high but not light and temperature. Thanks to these internal reserves *Laminaria longicruris* can extend its growth several months after the decrease of N in the environment (Gagné et al., 1982).

The fast absorption or resistance to low nutrient contents can lead to competition between species: some species can take advantage during nutrient peaks, modifying the composition of algal communities since slow-growing benthic macrophytes are replaced by opportunistic ephemeral macroalgae with fast growth and high nutrient demands (Pedersen & Borum, 1996). If concentrations are too high, nutrients can be responsible for seasonal algal blooms (Heisler et al., 2008). This phenomenon of excessive algal biomass production is increasing from year to year due to eutrophication of the marine environment and nutrient inputs near agricultural lands or factories. Many algal blooms have been reported worldwide, mainly due to cyanobacteria, diatoms or some green algae, but there are also massive seasonal strandings of red and brown seaweeds (Teichberg, Martinetto, & Fox, 2012). Recently, nitrogen sources from the

Amazon and Congo rivers are suspected to stimulate the growth and proliferation of pelagic *Sargassum* spp. in the North Atlantic Ocean (Ody et al., 2019; Oviatt, Huizenga, Rogers, & Miller, 2019). These developments modify community structures, impacting biodiversity and local economy (Teichberg et al., 2012).

Similarly to nutrients, metals occur naturally in seawater at low concentrations; but elevated levels may occur in coastal waters due to contamination near mines, harbours, and industrial activity (e.g. Nriagu, 1990) which then can pose a threat to marine life if they are bioaccumulated. However, the metal bioavailability depends on many factors such as the salinity or the acidity of seawater. Among trace metals, copper is one of the most toxic: for example, for brown macroalgae, copper in excess inhibits photosynthesis (Connan & Stengel, 2011a), restrict growth (Nielsen, Brownlee, Coelho, & Brown, 2003), and disrupt gametophyte development (Garman, Pillai, & Cherr, 1994). Copper also affects the distribution of other algal compounds such as proteins (Contreras, Moenne, Gaillard, Potin, & Correa, 2010), free fatty acids (Ritter et al., 2008), phenolic compounds (Connan & Stengel, 2011b), and induces oxidative stress (Contreras, Mella, Moenne, & Correa, 2009).

Impact of biotic parameters

Microfouling

Any substrate immersed in aqueous solution is immediately colonized by organic molecules (forming the primary film) that are consumed by bacteria followed by microalgae and fungi (Lewis, 1998). These microorganisms constitute the microfouling that will be used by other benthic macroorganisms such as invertebrates or macroalgae for their settlement. In the marine environment, over 4,000 organisms, including algae, are able to form fouling (Chambers, Stokes, Wahsh, & Wood, 2006; Yebra, Kiil, & Dam-Johansen, 2004). Macroalgae represent a living substrate on which other organisms, plant or animal, can attach themselves. The community of the epiphytic bacteria is mainly host specific (according to the species of alga) and is changing according to the part of the thallus, site and/or season (for example: Bengtsson, Sjøtun, and Øvreås (2010) and Mancuso, D'Hondt, Willems, Airoldi, and, De Clerck (2016) on brown seaweed and de Oliveira et al. (2012) for red macroalgae). The physiological state of the basiphyte will also influence the settlement of epiphytic bacteria: Marzinelli et al. (2015) observed that microbial communities were strongly associated with the physiological condition of the brown alga *Ecklonia radiata* (healthy versus stressed). The epiphytic bacteria interact with seaweeds, thereby modulating the health and of their host. They may have positive effect on the basiphyte

as being involved in their morphology and physiology. For example, when cultured in an axenic environment, some seaweed species will develop abnormal morphologies which become normal again when bacteria are added suggesting the synthesis by the bacteria of compounds necessary for the macroalgal morphology (Egan et al., 2013); Weinberger et al. (2007) have also observed that secondary compounds produce by the bacteria are important in the algal spore release and settlement. Moreover, cyanobacteria are often abundant on benthic macroalgae probably due to their nitrogen fixing function that will help the macroalga in relatively poor nitrogen environment (de Oliveira et al., 2012). This strong relationship was emphasized by Egan et al. (2013) who suggested the use of the term holobiont for the association seaweed-bacteria, similarly to the coral.

On the other hand, biofilms can reduce the access of their host to light, gases and nutrients and alter the interaction with other fouling epibionts, consumers and pathogens (Goecke, Labes, Wiese, & Imhoff, 2010; Wahl, Goecke, Labes, Dobretsov, & Weinberger, 2012). To limit or reduce the microfouling, macroalgae will produce metabolites. For example, some red and brown macroalgae are able to produce oxidative burst against epiphytic bacteria. Küpper, Kloareg, Guern, and Potin (2001), and Küpper, Muller, Peters, Kloareg, and Potin (2002) reported that

brown macroalgae from the orders Laminariales and Desmarestiales and the species *Pylaiella littoralis* produce rapidly H_2O_2 in response to the degradation of cell wall alginates and thus the liberation of alginates oligomers by bacteria. Similarly, red macroalgae and especially *Gracilaria conferta*, produce this oxidative burst in response to agar oligomers, which resulted in a 60% reduction of agarolytic bacterial pathogens (Weinberger & Friedlander, 2000). Plouguerné et al. (2008) worked on two invasive species, the red macroalga *Grateloupia turuturu* and the brown *Sargassum muticum*, which presented clean surface, without epiphytes. They demonstrated the importance of lipidic molecules as potential defense against microfouling: cholesteryl formate and glycolipids in respectively *G. turuturu* (Plouguerné, Kikuchi, Oshima, Deslandes, & Stiger-Pouvreau, 2006a) and *S. muticum* (Plouguerné et al. 2010). Hellio, Bergé, Beaupoil, Le Gal, and Bourgoignon (2002) carried out screenings on French intertidal seaweeds and demonstrated that extracts of red and brown species, especially the red macroalgae *Vertebrata* (formerly *Polysiphonia*) *lanosa* and *Chondrus crispus* and the brown seaweeds *Undaria pinnatifida* and *S. muticum*, are a source of antifouling molecules.

Epiphytes and endophytes

Following the development of microorganisms at the surface of the macroalgae (first step of the biofouling), a secondary colonisation occur with

macroorganisms such as other algae or animals, that settle on the algal surface. Other organisms will colonize the subsurface and enter into the seaweed thallus. The first group of species are called epiphytes as being epibiont of an alga (called basiphyte), and the other endophytes. The carrying of epiphytes is common on marine algae, ranging from obligate relationships (such as the red macroalga *Vertebrata lanosa* on the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*; Garbary, Miller, & Scrosati, 2014) to species that colonize any available space. Five anatomical relationships between epiphyte and their host have been detected (reviewed in Potin, 2012) from the weakly attachment to the host surface with no tissue damage (Type I) up to the deep penetration of the epiphyte into the host cortex, reaching the medullary tissue, and causing the destruction of the host's cells in the area around the infection (Type V).

As for microfouling, the abundance and diversity of epiphytes follow a seasonal pattern (*e.g.* higher diversity and biomass of epiphytes on the brown macroalga *Fucus vesiculosus* in spring-summer; Rindi & Guiry, 2004). Spatial variation in the epiphyte community on the stipes of the brown alga *Laminaria hyperborea* was recorded in Scotland with differences with the depth along a stipe and according to the host position on the shore (Whittick, 1983). The age of the algal part also affected the epiphyte abundance, with epiphyte densities greatest on the oldest tissue;

surface rugosity also affected fouling (Jennings & Steinberg, 1997). The epiphytes, as they live at the surface of the seaweeds, will reduce the amount of light reaching the basiphyte thus impacting the algal photosynthesis (Sand-Jensen, 1977), compete for nutrients and gases and reduce water motion surrounding the host, and thus impacting the host growth (Buschmann & Gomez, 1993). Epiphytes will add weight to the host alga promoting the detachment of the entire, or part of it (*e.g.* Buschmann & Gomez, 1993; Kraberg & Norton, 2007). Epiphytes also decrease the reproductive effort of algae (*e.g.* *V. lanosa* on *A. nodosum*; Kraberg & Norton, 2007). Finally epiphytes will release metabolites in the surrounding water that can promote or be detrimental to the host algae (see Harlin, 1987 for a review).

On the other hand, epiphytes may also have a positive effect on the basiphyte by, for example, reducing the desiccation experienced at low tide by the host or protecting the basiphyte from grazers (Karez, Engelbrecht, & Sommer, 2000; see following section). On the other side, as for the primary foulers, the seaweed host can exhibit a variety of defense against the epiphyte attachment (Ducker & Knox, 1984), including the production of a mucilaginous covering, a rapid growth, a sloughing of outer cell walls such as in brown macroalgae belonging to Fucales (Filion-Myklebust & Norton, 1981; Moss, 1982), allelopathy or the release of toxic chemicals such

as phenolics (Rönnerberg & Ruokolahti, 1986), although this activity of phenolics is sometimes controversial (Jennings & Steinberg, 1997). The algal host will thus modify its metabolism and produce compounds to eliminate or control the epi- and endophytes growing on or in its thallus. For example, red and brown macroalgae are known to produce terpenes with antifouling activity against microorganisms (see previous section) but also against animals. Schmitt, Hay, and Lindquist (1995) identified the diterpenes pachydictyol A and dictyol E in the brown macroalga *Dictyota menstrualis* which are active against the settlement of algal epiphyte and of bryozoan larvae (*Bugula neritina*). The red macroalga *Delisea pulchra* produces halogenated furanones which were the most effective natural product against the settlement of barnacles (de Nys et al., 1995).

Many filamentous epiphytes can also develop into endophytes through notably the expansion of rhizoids or the filaments embedded into the host thallus (Leonardi et al., 2006; Chirapart, Praiboon, Boonprab, & Puangsombat, 2018). A benthic diatom, *Pseudogomphonema* sp. has also been found living and reproducing into the red macroalga *Neoabbottiella* sp. (Klochkova et al., 2014). Generally, endophytes are bacteria, fungi or other algae that live into their host but these relationships are species-specific from being innocuous up to pathogenic (Schoenrock, Amsler, McClintock, & Baker, 2013). There is also

many metabolites exchange between the endophyte and the seaweed host. Endophytes induce morphological modifications (such as kelp twisted stipes and blades; Lein, Sjøtun, & Wakili, 1991) of the host up to the development of galls (Apt, 1988). The brown algal endophyte *Laminariocolax aecidioides* (previously *Streblonema aecidioides*) causes tissue thickening in the brown *Saccharina latissima* (Peters & Schaffelke, 1996), but has no impact on the sorus maturation of *Undaria pinnatifida* (Gauna, Parodi, & Cáceres, 2009). The red macroalgae *Chondrus crispus* and *Mazzaella laminarioides* both developed severe lesions and cellular damage when infected by the green algae *Ulvea* (previously *Acrochaete*) *operculata* (Correa & McLachlan, 1992) and *U. ramosa* (previously *Endophyton ramosum*) (Correa, Flores & Garrido, 1994), respectively. As against bacterial fouling (see previous section), *C. crispus* resisted to the infection by *U. operculata* through the setting up of an oxidative burst resulting from the contact between carrageenan and the green algal filaments (Weinberger et al., 2005), burst which is stronger in the gametophyte than the sporophyte of *C. crispus* (Bouarab, Potin, Correa, & Kloareg, 1999). One positive reported effect of the presence of epiphyte or endophyte for their host is the decrease in algal palatability for grazers (Karez et al., 2000; Amsler, Amsler, McClintock, & Baker, 2009), although both can sometimes attract grazers to the basiphyte

(Wahl et al. 1997; Campbell, Vergés, & Steinberg, 2014).

Grazing

Algal grazing is a structuring element in the coastal communities because herbivores are able to remove considerable amounts of seaweed biomass (Lubchenco & Gaines, 1981). For example, uncontrolled urchin populations may impact a seaweed community up to completely remove the macroalgae and leave “urchin barrens” where only encrusting algae may survive such as in Norway or Alaska (Steneck et al., 2002). Grazers reduced the growth and reproduction of seaweeds (e.g. *Fucus gardneri*; Dethier, Williams, & Freeman, 2005) and induced the breaking down of seaweeds by removing parts that weakened their thalli and making them more vulnerable to hydrodynamism (review in Iken, 2012).

Some macroalgae modify their morphology in response to an herbivore presence: for example transplantation of the brown macroalga *Padina sanctae-crucis* (previously *P. jamaicensis*) into a grazing-protected area resulted in a rapid morphological shift from prostrate, highly branched turf to an erect foliose morphology (Lewis, Norris, & Searles, 1987). Another algal morphological change to decrease grazing is the inclusion of calcium carbonate into the thallus often concomitant with the synthesis of chemical defense (Paul & Hay, 1986). Brown macroalgae produce phenolic compounds whose role as anti-

grazing molecule has been either observed (e.g. Geiselman & McConnell, 1981) or not (e.g. Kubanek, Lester, Fenical, & Hay, 2004) depending on the algal or herbivore species. Brown seaweeds belonging to Dictyotales are known to produce many defensive secondary metabolites with many having anti-herbivorous activity (reviewed in Amsler & Fairhead, 2005): for example, *Dictyota* spp. produce terpenes and notably pachydictyol-A (diterpene alcohol) which showed anti-grazing activity against many fishes, sea urchins and amphidods (Hay & Fenical, 1992). Flöthe, Molis, Kruse, Weinberger, and John (2014) studied the molecular response of the brown macroalga *Fucus vesiculosus* to grazing of the isopod *Idotea baltica*: algal defense was induced by the grazing and they found up to ~500 genes that were up (e.g. lipid, carbohydrate metabolism, defense and stress response) or down-regulated (such as photosynthesis) and indicative thus of algal metabolic changes. These changes were also herbivore specific as the grazing by a periwinkle (*Littorea obtusata*) showed different transcriptome changes (Flöthe, Molis, & John, 2014). The same isopod produced also inducible defense in three red macroalgae *Furcellaria lumbricalis*, *Delesseria sanguinea* and *Phyllophora pseudoceranooides* in feeding experiments (Rhode & Wahl, 2008). *Delisea pulchra* produced halogenated polyketide metabolites or furanones (de Nys, Wright, König, & Sticher, 1993), which protect the alga not only

against fouling (see previous section) but also grazers (Wright, de Nys, Poore, & Steinberg, 2004). A rapid response of two kelp species (*Lessonia spicata* and *Laminaria digitata*) to grazing by their main herbivores was observed by Ritter et al. (2017): seaweeds produced first sulphur containing amino acids followed by free fatty acids liberation and eicosanoid oxylipins synthesis likely representing metabolites related to stress. Sometimes the production of defense metabolites by the seaweed does not need a physical contact between the seaweed and the grazer: for example, the brown macroalga *Ascophyllum nodosum* when grazed will produce and release compounds in the surrounding seawater that will enable neighboring *A. nodosum* thalli to produce defense compounds even if they were not grazed (Toth & Pavia, 2000).

Conclusion

Macroalgae in rockyshores are subjected to various environmental factors, such as hydrodynamism, desiccation, light, salinity and temperature (Fig. 1). However, these different disturbances vary during the day (tidal cycle or nycthemeral cycle), the season, or the geographical area, impacting the distribution of algae, whether between shores, or within the same shore (vertical zonation). To cope with this highly variable environment, seaweeds must therefore have a high adaptative ability to respond to significant changes that can occur in

just a few hours. They are thus able to adapt their photosynthesis, respiration or reproduction; and to synthesize a wide range of compounds, including pigments (photosynthetic or photoprotective), mycosporine-like amino acids, lipids, proteins, polysaccharides, or phenolic compounds, specific to each species. Nevertheless, different stresses can act at the same time on the shore, and have a synergistic effect, making it complex to attribute the synthesis of a compound to a particular factor. In order to better understand the ecological and physiological responses of algae, it is therefore important to carry out field monitoring to study algae in their own environment with all factors; and to carry out culture experiments in the laboratory to test the impact of different stresses one by one or in combination.

In addition, by biometism, the study and understanding of the synthesis of these protective compounds can provide inspiration for valorization in various fields such as medicine, cosmetics (reviewed by Stiger-Pouvreau & Guérard, 2018), fertilizer, antifouling paints (Hellio, De La Broise, Dufosse, Le Gal, & Bourgougnon, 2001) or biofuel. Thus, algae have a high potential since they are a highly diversified resource that is much less studied than terrestrial plants. In this sense, there are for example, cosmetic products with algal photoprotective compounds to reduce skin ageing and the development of skin cancer, such

as the MAAs shinorine and porphyra-334 extracted from the red macroalga *Porphyra umbilicalis* in Helioguard 365 (Mibelle group, Switzerland), a commercial formulation used to protect the skin from UV radiation (La Barre, Roullier, & Boustie, 2014).

Finally, human activities are increasing, resulting in a stronger anthropogenic impact on the environment: they generate significant greenhouse gas emissions, which are mainly responsible of global warming and ocean acidification. These changes disrupt the physiology and ecology of many algal species (Walther, 2010). In particular, the geographical distribution of algae is guided by climatic limits and climate change induce recurrent exposition of species to extreme temperatures, variable in time and leading to a switch of species to northern latitudes but also a succession of scattered local extinctions (e.g. in Portugal; Lima, Ribeiro, Queiroz, Hwakins, & Santos, 2007). There are causing the reorganization of local communities as species are added or deleted and some species may develop in areas where they could not previously survive or reproduce. In this sense, synthesis of the different seaweed assemblages of each region have already been made (Garbary, 2001; Lüning, 1990; van den Hoek, 1984), but it is important to carry out periodically local checklists as some species are expected to migrate or disappear with human activity and climate change. In particular, in

recent years, the massive stranding of algae and the proliferation of invasive algae have increased. Climate change also affected interactions among marine organisms: for example, elevated temperature reduced herbivore defenses in *Fucus vesiculosus* (Weinberger et al., 2011) and facilitate bacterial infections (Harley et al., 2012). Seaweed thus have to cope with these rapid changes in their environment.

References

- Abe, S., Kurashima, A., Yokohama, Y., & Tanaka, J. (2001). The cellular ability of desiccation tolerance in Japanese intertidal seaweeds. *Botanica Marina*, *44*, 125-131. Doi:/10.1515/BOT.2001.017
- Abreu, M.H., Pereira, R., Buschmann, A.H., Sousa-Pinto, I., & Yarish, C. (2011). Nitrogen uptake responses of *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss under combined and single addition of nitrate and ammonium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *407*, 190–199. doi:10.1016/j.jembe.2011.06.034
- Amsler, C.D., Amsler, M.O., McClintock, J.B. & Baker, B.J. (2009). Filamentous algal endophytes in macrophytic Antarctic algae: prevalence in hosts and palatability to mesoherbivores. *Phycologia*, *48*, 324-334. doi:10.2216/08-79.1
- Amsler, C.D., & Fairhead, V.A. (2005). Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Advances in Botanical Research*, *43*, 1-91.
- Apt, K.E. (1988). Galls and tumor-like growth on marine macroalgae. *Diseases of Aquatic Organisms*, *3*, 211–217.
- Ar Gall, E., & Le Duff, M. (2014). Development of a quality index to evaluate the structure of macroalgal communities. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *139*, 99–109. doi:10.1016/j.ecss.2013.12.028

- Ayres-Ostrock, L.M., & Plastino, E.M. (2014). Effects of UV-B radiation on growth rates, pigment content and ultrastructure of red (wild type), greenish-brown and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). *European Journal of Phycology*, *49*, 197–212. doi:10.1080/09670262.2014.904931
- Bhatia, S., Sharma, K., Sharma, A., & Purohit, A.P. (2011). Mycosporine and mycosporine-like amino acids: a paramount tool against ultra violet irradiation. *Pharmacognosy Review*, *5*, 138–146. doi:10.4103/0973-7847.91107.
- Benes, K.M., & Bracken, M.E.S. (2016). Nitrate uptake varies with tide height and nutrient availability in the intertidal seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Phycology*, *52*, 863–876. doi:10.1111/jpy.12454
- Bengtsson, M.M., Sjøtun, K., & Øvreås, L. (2010). Seasonal dynamics of bacterial biofilms on the kelp *Laminaria hyperborea*. *Aquatic Microbial Ecology*, *60*, 71–83. doi:10.3354/ame01409
- Bérard-Therriault, L., & Cardinal, A. (1973). Importance de certains facteurs écologiques sur la résistance à la dessiccation des Fucacées (Phaeophyceae). *Phycologia*, *12*, 41–52. doi:10.2216/i0031-8884-12-1-41.1
- Binet, P. (1956). II. L'émersion des Algues marines: étude physiologique. [Emersion of marine algae: physiological study] *Bulletin de la Société Botanique de France*, *103*, 386–400. doi:10.1080/00378941.1956.10837787
- Bird, C.J., & McLachlan, J. (1986). The effect of salinity on distribution of species of *Gracilaria* Grev. (Rhodophyta, Gigartinales): an experimental assessment. *Botanica Marina*, *29*, 231–238. doi:10.1515/botm.1986.29.3.231
- Bird, C.E., Franklin, E.C., Smith, C.M., & Toonen, R.J. (2013). Between tide and wave marks: a unifying model of physical zonation on littoral shores. *PeerJ*, *1*, e154. doi:10.7717/peerj.154
- Bischof, K., Hanelt, D., & Wiencke, C. (2000). Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. *Planta*, *211*, 555–562. doi:10.1007/s004250000313
- Blunden, G., Smith, B.E., Irons, M.W., Yang, M-H., Roch, O.G., & Patel, A.V. (1992). Betaines and tertiary sulphonium compounds from 62 species of marine algae. *Biochemical Systematics and Ecology*, *20*, 373–388. doi:10.1016/0305-1978(92)90050-N
- Boller, M.L., & Carrington, E. (2006). The hydrodynamic effects of shape and size change during reconfiguration of a flexible macroalga. *Journal of Experimental Biology*, *209*, 1894–1903. doi:10.1242/jeb.02225
- Bolton, J.J. (1994). Global seaweed diversity: patterns and anomalies. *Botanica Marina*, *37*, 241–245. doi:10.1515/botm.1994.37.3.241
- Bouarab, K., Potin, P., Correa, J.A., & Kloareg, B. (1999). Sulphated oligosaccharides mediate the interaction between a marine red alga and its green algal pathogenic endopyhte. *Plant Cell*, *11*, 1635–50. doi:10.1105/tpc.11.9.1635
- Brenchley, J.L., Raven, J.A., & Johnston, A.M. (1997). Resource acquisition in two intertidal fucoid seaweeds, *Fucus serratus* and *Himantalia elongata*: seasonal variation and effects of reproductive development. *Marine Biology*, *129*, 367–375. doi:10.1007/s002270050177
- Broberg, A., Kenne, L., & Pedersen, M. (1998). In-situ identification of major metabolites in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis* using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta*, *206*, 300–307. doi:10.1007/s004250050404
- Buschmann, A.H., & Gómez, P. (1993). Interaction mechanisms between *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) and epiphytes. *Hydrobiologia*, *260*, 345–351. doi:10.1007/BF00049039
- Campbell, A.H., Vergés, A., & Steinberg, P.D. (2014). Demographic consequences of disease in a habitat-forming seaweed and impacts on interactions between natural enemies. *Ecology*, *95*, 142–152. doi:10.1890/13-0213.1

- Chambers, L.D., Stokes, K.R., Walsh, F.C., & Wood, R.J.K. (2006). Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface & Coatings Technology*, *201*, 3642–3652. doi:10.1016/j.surfcoat.2006.08.129
- Chirapart, A., Praiboon, J., Boonprab, K., & Puangsombat, P. (2018). Epiphytism differences in the commercial species of *Gracilaria*, *G. fisheri*, *G. tenuistipitata*, and *G. salicornia*, from Thailand. *Journal of Applied Phycology*, *30*, 3413–3423. doi:10.1007/s10811-018-1570-7
- Connan, S., Deslandes, E., & Ar Gall, E.A. (2007). Influence of day-night and tidal cycles on phenol content and antioxidant capacity in three temperate intertidal brown seaweeds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *349*, 359–369. doi:10.1016/j.jembe.2007.05.028
- Connan, S., & Stengel, D.B. (2011a). Impacts of ambient salinity and copper on brown algae: 1. Interactive effects on photosynthesis, growth, and copper accumulation. *Aquatic Toxicology*, *104*, 94–107. doi:10.1016/j.aquatox.2011.03.015
- Connan, S., & Stengel, D.B. (2011b). Impacts of ambient salinity and copper on brown algae: 2. Interactive effects on phenolic pool and assessment of metal binding capacity of phlorotannin. *Aquatic Toxicology*, *104*, 1–13. doi:10.1016/j.aquatox.2011.03.016
- Contreras, L., Mella, D., Moenne, A., & Correa, J.A. (2009). Differential responses to copper-induced oxidative stress in the marine macroalgae *Lessonia nigrescens* and *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae). *Aquatic Toxicology*, *94*, 94–102. doi:10.1016/j.aquatox.2009.06.004
- Contreras, L., Moenne, A., Gaillard, F. Potin, P., & Correa J.A. (2010). Proteomic analysis and identification of copper stress-regulated proteins in the marine alga *Scytosiphon gracilis* (Phaeophyceae). *Aquatic Toxicology*, *96*, 85–89. doi:10.1016/j.aquatox.2009.10.007
- Contreras-Porcía, L., López-Cristoffanini, C., Meynard, A., & Kumar, M. (2017). Tolerance pathways to desiccation stress in seaweeds. In Kumar, M., & Ralph, P. (Eds.), *Systems Biology of Marine Ecosystems* (pp. 13–33). doi:10.1007/978-3-319-62094-7_2
- Contreras-Porcía, L., Thomas, D., Flores, V., & Correa, J.A. (2011). Tolerance to oxidative stress induced by desiccation in *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Experimental Botany*, *62*, 1815–1829. doi:10.1093/jxb/erq364
- Corey, P., Kim, J.K., Duston, J., Garbary, D.J., & Prithiviraj, B. (2013). Bioremediation potential of *Palmaria palmata* and *Chondrus crispus* (Basin Head): effect of nitrate and ammonium ratio as nitrogen source on nutrient removal. *Journal of Applied Phycology*, *25*, 1349–1358. doi:10.1007/s10811-013-9977-7
- Correa, J.A., Flores, V., & Garrido, J. (1994). Green patch disease in *Iridaea laminarioides* (Rhodophyta) caused by *Endophyton* sp. (Chlorophyta). *Diseases of Aquatic Organisms*, *19*, 203–213. doi:10.3354/dao019203
- Correa, J.A., & McLachlan, J.L. (1992). Endophytic algae of *Chondrus crispus* (Rhodophyta). IV. Effects on the host following infections by *Acrochaete operculata* and *A. heteroclada* (Chlorophyta). *Marine Ecology Progress Series*, *81*, 73–87. doi:10.3354/meps081073
- Craigie, J.S., Morris, E.R., Rees, D.A., & Thom, D. (1984). Alginate block structure in Phaeophyceae from Nova Scotia: Variation with species, environment and tissue-type. *Carbohydrate Polymers*, *4*, 237–252. doi:10.1016/0144-8617(84)90001-8
- de Nys, R., Steinberg, P.D., Willemsen, P., Dworjanyn, S.A., Gabelish, C.L., & King, R.J. (1995). Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. *Biofouling*, *8*, 259–271. doi:10.1080/08927019509378279
- de Nys, R., Wright, A.D., König, G.M., & Sticher, O. (1993). New halogenated furanones from the marine alga *Delisea pulchra* (cf. *fimbriata*). *Tetrahedron*, *49*, 11213–11220. doi:10.1016/S0040-4020(01)81808-1
- de Oliveira, L.S., Gregoracci, G.B., Silva, G.G.Z., Salgado, L.T., Filho, G.A., Alves-Ferreira, M., ... Thompson, F.L. (2012). Transcriptomic analysis

- of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Florideophyceae, Rhodophyta) and its microbiome. *BMC genomics*, *13*, 487. doi:10.1186/1471-2164-13-487
- Dethier, M.N., Williams, S.L., & Freeman, A. (2005). Seaweeds under stress: manipulated stress and herbivory affect critical life-history functions. *Ecological Monographs*, *75*, 403–418. doi:10.1890/03-4108
- Ding, L., Ma, Y., Huang, B., & Chen, S. (2013). Effects of seawater salinity and temperature on growth and pigment contents in *Hypnea cervicornis* J. Agardh (Gigartinales, Rhodophyta). *BioMed Research International*, 1–10. doi:10.1155/2013/594308
- Dring, M.J., & Brown, F.A. (1982). Photosynthesis of intertidal brown algae during and after periods of emersion: a renewed search for physiological causes of zonation. *Marine Ecology Progress Series*, *8*, 301–308. doi:10.3354/meps008301
- Ducker, S.C., & Knox, R.B. (1984). Epiphytism at the cellular level with special references to algal epiphytes. In Linskens, H.-F., Heslop-Harrison, J. (Eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology* (pp. 113-133). Springer, Berlin.
- Dumay, J., Morançais, M., Munier, M., Le Guillard, C., & Fleurence, J. (2014). Phycoerythrins: valuable proteinic pigments in red seaweeds. *Advances in Botanical Research*, *71*, 321–343. doi:10.1016/B978-0-12-408062-1.00011-1
- Einav, R., Breckle, S., & Beer, S. (1995). Ecophysiological adaptation strategies of some intertidal marine macroalgae of the Israeli Mediterranean coast. *Marine Ecology Progress Series*, *125*, 219–228.
- Egan, S., Harder, T., Burke, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S., & Thomas, T. (2013). The seaweed holobiont: understanding seaweed–bacteria interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, *37*, 462-476. doi:10.1111/1574-6976.12011
- Eggert, A. (2012) Seaweed responses to temperature. In Wiencke, C., & Bischof, K. (Eds.), *Seaweed Biology. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)* (pp. 47-66). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Falkowski, P.G. & Raven, J.A. (2013). An Introduction to Photosynthesis in Aquatic Systems. In Falkowski, P.G. & Raven, J.A. (Eds.) *Aquatic photosynthesis* (2nd ed) (pp. 1-43). Princeton University Press, Oxford.
- Fattorusso, E., & Piatelli, M. (1980). Amino acids from marine algae. In Scheuer, P.J. (Ed.), *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives* (pp. 95-140). Elsevier.
- Fierro, C., López-Cristoffanini, C., Meynard, A., Lovazzano, C., Castañeda, F., Guajardo, E., & Contreras-Porcia, L. (2017). Expression profile of desiccation tolerance factors in intertidal seaweed species during the tidal cycle. *Planta*, *245*, 1149–1164. doi:10.1007/s00425-017-2673-0
- Filion-Myklebust, C., & Norton, T. (1981). Epidermis shedding in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis, and its ecological significance. *Marine Biology Letters*, *2*, 45-51.
- Flores-Molina, M.R., Thomas, D., Lovazzano, C., Núñez, A., Zapata, J., Kumar, M., ... Contreras-Porcia, L. (2014). Desiccation stress in intertidal seaweeds: Effects on morphology, antioxidant responses and photosynthetic performance. *Aquatic Botany*, *113*, 90–99. doi:10.1016/j.aquabot.2013.11.004
- Flöthe, C.R., Molis, M., & John, U. (2014). Induced resistance to periwinkle grazing in the brown seaweed *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae): molecular insights and seaweed-mediated effects on herbivore interactions. *Journal of Phycology*, *50*, 564-576. doi:10.1111/jpy.12186
- Flöthe, C.R., Molis, M., Kruse, I., Weinberger, F., & John, U. (2014). Herbivore-induced defence response in the brown seaweed *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae): temporal pattern and gene expression. *European Journal of Phycology*, *49*, 356-369. Doi:10.1080/09670262.2014.946452

- Franklin, L.A., Osmond, C.B., & Larkum, A.W. (2003). Photoinhibition, UV-B and algal photosynthesis. In Larkum, A.W.D., Douglas, S.E., & Raven, J.A. (Eds.), *Photosynthesis in algae* (pp. 351-384). Springer, Dordrecht.
- Fujita, R.M., Wheeler, P.A., & Edwards, R.L. (1989). Assessment of macroalgal nitrogen limitation in a seasonal upwelling region. *Marine Ecology Progress Series*, 53, 293-303. doi:10.3354/meps053293
- Fuller, S.W., & Mathieson, A.C. (1972). Ecological studies of economic red algae. IV. Variations of carrageenan concentration and properties in *Chondrus crispus* Stackhouse. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 10, 49-58. doi:10.1016/0022-0981(72)90092-5
- Gagné, J.A., Mann, K.H., & Chapman, A.R.O. (1982). Seasonal patterns of growth and storage in *Laminaria longicuris* in relation to differing patterns of availability of nitrogen in the water. *Marine Biology*, 69, 91-101. doi:10.1007/BF00396965
- Gao, S., & Wang, G. (2012). The enhancement of cyclic electron flow around photosystem I improves the recovery of severely desiccated *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Experimental Botany*, 63, 4349-4358. doi:10.1093/jxb/ers082
- Garbary, D.J. (2001). Biogeography of marine algae. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-9.
- Garbary, D.J., Miller, A.G., & Scrosati, R.A. (2014). *Ascophyllum nodosum* and its symbionts: XI. The epiphyte *Vertebrata lanosa* performs better photosynthetically when attached to *Ascophyllum* than when alone. *Algae*, 29, 321-331. doi:10.4490/algae.2014.29.4.321
- Garman, G.D., Pillai, M.M., & Cherr, G.N. (1994). Inhibition of cellular events during early algal gametophyte development: effects of select metals and an aqueous petroleum waste. *Aquatic Toxicology*, 28, 127-144. doi:10.1016/0166-445X(94)90025-6
- Gauna, M.C., Parodi, E.R., & Cáceres, E.J. (2009). Epi-endophytic symbiosis between *Laminariocolax aecidioides* (Ectocarpales, Phaeophyceae) and *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) growing on Argentinian coasts. *Journal of Applied Phycology*, 21, 11-18. doi:10.1007/s10811-007-9298-9
- Geiselman, J.A., & McConnell, O.J. (1981). Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*. *Journal of Chemical Ecology*, 7, 1115-1133.
- Gerard, V.A. (1982). *In situ* water motion and nutrient uptake by the giant kelp *Macrocystis pyrifera*. *Marine Biology*, 69, 51-54. doi:10.1007/BF00396960
- Gessner F. (1969). Photosynthesis and ion loss in the brown algae *Dictyopteris membranacea* and *Fucus virsoides*. *Marine Biology*, 4, 349-351. doi:10.1007/BF00350365
- Goecke, F., Labes, A., Wiese, J., & Imhoff, J.F. (2010). Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 409, 267-300. doi:10.3354/meps08607
- Gordon, R., & Brawley, S.H. (2004). Effects of water motion on propagule release from algae with complex life histories. *Marine Biology*, 145, 21-29. doi:10.1007/s00227-004-1305-y
- Goulard, F., Diouris, M., Quéré, G., Deslandes, E., & Floc'h, J.-Y. (2001). Salinity effects on NDP-sugars, floridoside, starch, and carrageenan yield, and UDP-glucose-pyrophosphorylase and epimerase activities of cultivated *Solieria chordalis*. *Journal of Plant Physiology*, 158, 1387-1394. doi:10.1078/0176-1617-00569
- Guajardo, E., Correa, J.A., & Contreras-Porcía, L. (2016). Role of abscisic acid (ABA) in activating antioxidant tolerance responses to desiccation stress in intertidal seaweed species. *Planta*, 243, 767-781. doi:10.1007/s00425-015-2438-6
- Guihéneuf, F., Gietl, A., & Stengel, D.B. (2018). Temporal and spatial variability of mycosporine-like amino acids and pigments in three edible red seaweeds from western Ireland. *Journal of Applied Phycology*, 30, 2573-2586. doi:10.1007/s10811-018-1436-z

- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2019). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.
- Hanelt, D., & Figueroa, F.L. (2012). Physiological and photomorphogenic effects of light on marine macrophytes. In Wiencke, C., & Bischof, K. (Eds.), *Seaweed biology* (pp. 3-23). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hanelt, D., & Nultsch, W. (2003). Photoinhibition in seaweeds. In Heldmaier, G., & Werner, D. (Eds.), *Environmental Signal Processing and Adaptation* (pp. 141-167). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Harley, C.D., Anderson, K.M., Demes, K.W., Jorve, J.P., Kordas, R.L., & Coyle, T.A. (2012). Effects of climate change on global seaweed communities. *Journal of Phycology*, 48, 1064-1078. doi:10.1111/j.1529-8817.2012.01224.x
- Harlin, M.M. (1987). Allelochemistry in marine macroalgae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 5, 237-249. doi:10.1080/07352688709382241
- Harnedy, P.A., & Fitzgerald, R.J. (2011). Bioactive proteins, peptides, and amino acids from macroalgae. *Journal of Phycology*, 47, 218-232. doi:10.1111/j.1529-8817.2011.00969.x
- Harrison, P., & Hurd, C. (2001). Nutrient physiology of seaweeds: Application of concepts to aquaculture. *Cahiers De Biologie Marine*, 42, 71-82.
- Hashimoto, H., Uragami, C., Cogdell, R.J. (2016). Carotenoids and photosynthesis. In Stange, C. (Ed.), *Carotenoids in Nature: Biosynthesis, Regulation and Function* (pp. 111-139). Springer, Switzerland.
- Hay, M.E., & Fenical, W. (1992). Chemical mediation of seaweed-herbivore interactions. In John, V.M., Hawkins, S.J., & Price, J.H. (Eds.), *Plant-animal interactions in the marine benthos* (pp. 317-337). Clarendon Press, Oxford, England.
- Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., ... Suddleson, M. (2008). Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae*, 8, 3-13. doi:10.1016/j.hal.2008.08.006
- Hellio, C., Bergé, J.P., Beupoil, C., Le Gal, Y., & Bourgougnon, N. (2002). Screening of marine algal extracts for antissettlement activities against microalgae and macroalgae. *Biofouling*, 18, 205-215. doi:10.1080/08927010290010137
- Hellio, C., De La Broise, D., Dufosse, L., Le Gal, Y. & Bourgougnon, N. (2001). Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Marine Environmental Research*, 52, 231-247. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(01\)00092-7](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(01)00092-7)
- Holzinger, A., Lütz, C., Karsten, U., & Wiencke, C. (2004). The effect of ultraviolet radiation on ultrastructure and photosynthesis in the red macroalgae *Palmaria palmata* and *Odonthalia dentata* from Arctic waters. *Plant Biology*, 6, 568-577. doi:10.1055/s-2004-821003
- Huner, N.P.A., Öquist, G., & Sarhan, F. (1998). Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science*, 3, 224-230. doi:10.1016/S1360-1385(98)01248-5
- Hunt, L.J.H., & Denny, M.W. (2008). Desiccation protection and disruption: a trade-off for an intertidal marine alga. *Journal of Phycology*, 44, 1164-1170. doi:10.1111/j.1529-8817.2008.00578.x
- Hurd, C.L. (2000). Water motion, marine macroalgal physiology, and production. *Journal of Phycology*, 36, 453-472. doi:10.1046/j.1529-8817.2000.99139.x
- Hurd, C.L., Berges, J.A., Osborne, J., & Harrison, P.J. (1995). An *in vitro* nitrate reductase assay for marine macroalgae: Optimization and characterization of the enzyme for *Fucus gardneri* (Phaeophyta). *Journal of Phycology*, 31, 835-843. doi:10.1111/j.0022-3646.1995.00835.x
- Hurd, C.L., & Dring, M.J. (1991). Desiccation and phosphate uptake by intertidal furoid algae in relation to zonation. *British Phycological Journal*, 26, 327-333. doi:10.1080/00071619100650291

- Hurd, C.L., Harrison, P.J., Bischof, K., & Lobban, C.S. (2014). *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press. 551pp.
- Iken, K. (2012). Grazers on benthic seaweeds. In Wiencke, C., & Bischof, K. (Eds.), *Seaweed biology* (pp. 157-175). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Inaba, M., Suzuki, I., Szalontai, B., Kanesaki, Y., Los, D.A., Hayashi, H., & Murata, N. (2003). Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *Synechocystis*. *Journal of Biological Chemistry*, *278*, 12191–12198. doi:10.1074/jbc.M212204200
- Impellizzeri, G., Mangiafico, S., Oriente, G., Piattelli, M., Sciuto, S., Fattorusso, E., ... Sica, D. (1975). Amino acids and low-molecular-weight carbohydrates of some marine red algae. *Phytochemistry*, *14*, 1549–1557. doi:10.1016/0031-9422(75)85349-0
- Ireland, H.E., Harding, S.J., Bonwick, G.A., Jones, M., Smith, C.J., & Williams, J.H.H. (2004). Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor*. *Biomarkers*, *9*, 139–155. doi:10.1080/13547500410001732610
- Jennings, J.G., & Steinberg, P.D. (1997). Phlorotannins versus other factors affecting epiphyte abundance on the kelp *Ecklonia radiata*. *Oecologia*, *109*, 461-473. doi:10.1007/s004420050106
- Ji, D., Li, B., Xu, Y., Chen, C., & Xie, C. (2015). Cloning and quantitative analysis of five heat shock protein 70 genes from *Pyropia haitanensis*. *Journal of Applied Phycology*, *27*, 499–509. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0314-6>
- Karentz, D. (2001). Chemical defenses of marine organisms against solar radiation exposure: UV-absorbing mycosporine-like amino acids and scytonemin. In McClintock, J., & Baker, B.J. (Eds.), *Marine Chemical Ecology* (pp. 481–520). CRC Press, Boca Raton.
- Karez, R., Engelbrecht, S., & Sommer, U. (2000). Co-consumption and protective coating: two new proposed effects of epiphytes on their macroalgal hosts in mesograzers-epiphyte-host interactions. *Marine Ecology Progress Series*, *205*, 85–93. doi:10.3354/meps205085
- Karsten, U. (2007). Salinity tolerance of Arctic kelps from Spitsbergen. *Phycological Research*, *55*, 257-262. doi:10.1111/j.1440-1835.2007.00468.x
- Karsten, U. (2008). Defense strategies of algae and cyanobacteria against solar ultraviolet radiation. In Amsler, C.D. (Ed.), *Algal Chemical Ecology* (pp. 273-296). Springer, Berlin.
- Karsten, U., West, J.A., Mostaert, A.S., King, R.J., Barrow, K.D., & Kirst, G.O. (1992a). Mannitol in the red algal genus *Caloglossa* (Harvey) J. Agardh. *Journal of Plant Physiology*, *140*, 292-297.
- Karsten, U., West, J.A., & Zuccarello, G. (1992b). Polyol content of *Bostrychia* and *Stictosiphonia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from field and culture. *Botanica Marina*, *35*, 11-19. doi:10.1515/botm.1992.35.1.11
- Kim, J.K., Kraemer, G.P., Neefus, C.D., Chung, I.K., & Yarish, C. (2007). Effects of temperature and ammonium on growth, pigment production and nitrogen uptake by four species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) native to the New England coast. *Journal of Applied Phycology*, *19*, 431–440. doi:10.1007/s10811-006-9150-7
- Kim, J.K., Kraemer, G.P., & Yarish, C. (2013). Emersion induces nitrogen release and alteration of nitrogen metabolism in the intertidal genus *Porphyra*. *PLoS ONE*, *8*, e69961. doi:10.1371/journal.pone.0069961
- Kirst, G.O. (1990). Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *41*, 21-53. doi:10.1146/annurev.pp.41.060190.000321
- Kloareg, B., & Quatrano, R.S. (1988). Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, *26*, 259-315.
- Klochkova, T.A., Pisareva, N.A., Park, J.S., Lee, J.H., Han, J.W., Klochkova, N.G., & Kim, G.H.

- (2014). An endophytic diatom, *Pseudogomphonema* sp. (Naviculaceae, Bacillariophyceae), lives inside the red alga *Neobobbittella* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *Phycologia*, 53, 205-214. doi:10.2216/13-229.1
- Korbee, N., Huovinen, P., Figueroa, F.L., Aguilera, J., & Karsten, U. (2005). Availability of ammonium influences photosynthesis and the accumulation of mycosporine-like amino acids in two *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta). *Marine Biology*, 146, 645–654. doi:10.1007/s00227-004-1484-6
- Krøber, A.C., & Norton, T.A. (2007). Effect of epiphytism on reproductive and vegetative lateral formation in the brown, intertidal seaweed *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *Phycological Research*, 55, 17-24. doi:10.1111/j.1440-1835.2006.00441.x
- Kraemer, G.P., & Chapman, J.C. (1991). Biomechanics and alginic acid composition during hydronynamic adaptation by *Egregia menziesii* (Phaeophyta) juveniles. *Journal of Phycology*, 27, 47–53.
- Krause-Jensen, D., & Duarte, C.M. (2016). Substantial role of macroalgae in marine carbon sequestration. *Nature Geoscience*, 9, 737–742. doi:10.1038/ngeo2790
- Kristensen, I. (1968). Surf influence on the thallus of furoids and the rate of desiccation. *Sarsia*, 34, 69–82. doi:10.1080/00364827.1968.10413372
- Kubanek, J., Lester, S.E., Fenical, W., & Hay, M.E. (2004). Ambiguous role of phlorotannins as chemical defenses in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Marine Ecology Progress Series*, 277, 79-93. doi:10.3354/meps277079
- Küpper, F.C., Kloareg, B., Guern, J., & Potin, P. (2001). Oligogulonates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiology*, 125, 278–291. doi:10.1104/pp.125.1.278
- Küpper, F.C., Muller, D.G., Peters, A.F., Kloareg, B., & Potin, P. (2002). Oligoalginat recognition and oxidative burst play a key role in natural and induced resistance of sporophytes of Laminariales. *Journal of Chemical Ecology*, 28, 2057–2081. doi:10.1023/A:1020706129624
- La Barre, S., Roullier, C., & Boustie, J. (2014). Mycosporine-like amino acids (MAAs) in biological photosystems. In La Barre, S., & Kornprobst, J.M. (Eds.), *Outstanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis* (pp. 333–360). Wiley-Blackwell, Weinheim.
- Lalegerie, F., Lajili, S., Bedoux, G., Taupin, L., Stiger-Pouvreau, V., & Connan S. (2019). Photo-protective compounds in red macroalgae from Brittany: Considerable diversity in mycosporine-like amino acids (MAAs). *Marine Environmental Research*, 147, 37–48. doi:10.1016/j.marenvres.2019.04.001
- Lamote, M., Johnson, L.E., & Lemoine, Y. (2012). Photosynthetic responses of an intertidal alga to emersion: The interplay of intertidal height and meteorological conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 428, 16–23. doi:10.1016/j.jembe.2012.05.021
- Latowski, D., Kuczyńska, P., & Strzałka, K. (2011). Xanthophyll cycle – a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Report*, 16, 78-90. doi:10.1179/174329211X13020951739938
- Lein, T.E., Sjøtun, K., & Wakili, S. (1991). Mass-occurrence of a brown filamentous endophyte in the lamina of the kelp *Laminaria hyperborea* (Gunnerus) Foslie along the southwestern coast of Norway. *Sarsia*, 76, 187-193. doi:10.1080/00364827.1991.10413474
- Le Lann, K., Rumin, J., Cérantola, S., Culioli, G., & Stiger-Pouvreau, V. (2014). Spatiotemporal variations of diterpene production in the brown macroalga *Bifurcaria bifurcata* from the western coasts of Brittany (France). *Journal of Applied Phycology*, 26, 1207–1214. doi:10.1007/s10811-013-0148-7
- Leonardi, P.I., Miravalles, A.B., Faugeton, S., Verónica, F., Beltrán, J., & Correa, J.A. (2006). Diversity, phenomenology and epidemiology of epiphytism in farmed *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) in northern Chile. *European*

- Journal of Phycology*, 41, 247–257. doi:10.1080/09670260600645659
- Levitus, S., Conkright, M.E., Reid, J.L., Najjar, R.G., & Mantyl, A. (1993). Distribution of nitrate, phosphate and silicate in the world oceans. *Progress in Oceanography*, 31, 245–273. doi:10.1016/0079-6611(93)90003-V.
- Lewis, J.A. (1998). Marine biofouling and its prevention on underwater surfaces. *Material Forum* 22, 41–61.
- Lewis, S.M., Norris, J.N., & Searles, R.B. (1987). The regulation of morphological plasticity in tropical reef algae by herbivory. *Ecology*, 68, 636–641.
- Lima, F.P., Ribeiro, P.A., Queiroz, N., Hawkins, S.J., & Santos, A.M. (2007). Do distributional shifts of northern and southern species of algae match the warming pattern? *Global Change Biology*, 13, 2592–2604. doi:10.1111/j.1365-2486.2007.01451.x
- López-Cristoffanini, C., Zapata, J., Gaillard, F., Potin, P., Correa, J.A., & Contreras-Porcía, L. (2015). Identification of proteins involved in desiccation tolerance in the red seaweed *Pyropia orbicularis* (Rhodophyta, Bangiales). *PROTEOMICS*, 15, 3954–3968. doi:10.1002/pmic.201400625
- Lubchenco, J., & Gaines, S.D. (1981). A unified approach to marine plant-herbivore interactions. I. Populations and communities. *Annual review of ecology and systematics*, 12, 405–437. doi:10.1146/annurev.es.12.110181.002201
- Lüning, K. (1990). *Seaweeds: Their Environment, Biogeography and Ecophysiology*. John Wiley and Sons, New York. 527pp.
- Lüning, K., & Dieck, I.T. (1989). Environmental triggers in algal seasonality. *Botanica Marina*, 32, 389–398. doi:10.1515/botm.1989.32.5.389
- Mancuso, F.P., D'Hondt, S., Willems, A., Airoidi, L., & De Clerck, O. (2016). Diversity and temporal dynamics of the epiphytic bacterial communities associated with the canopy-forming seaweed *Cystoseira compressa* (Esper) Gerloff and Nizamuddin. *Frontiers in microbiology*, 7, 476. doi:10.3389/fmicb.2016.00476
- Manríquez-Hernández, J.A., Duston, J., & Garbary, D.J. (2016). Effect of irradiance on bioremediation capacity of the red algae *Chondrus crispus* and *Palmaria palmata*. *Aquaculture International*, 24, 39–55. doi:10.1007/s10499-015-9907-6
- Martínez, B., & Rico, J.M. (2002). Seasonal variation of P content and major N pools in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 38, 1082–1089. doi:10.1046/j.1529-8817.2002.01217.x
- Martínez, B., & Rico, J.M. (2004). Inorganic nitrogen and phosphorus uptake kinetics in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 40(4), 642–650. doi:10.1111/j.1529-8817.2004.03116.x
- Marzinelli, E.M., Campbell, A.H., Zozaya Valdes, E., Vergés, A., Nielsen, S., Wernberg, T., ... & Steinberg, P.D. (2015). Continental-scale variation in seaweed host-associated bacterial communities is a function of host condition, not geography. *Environmental Microbiology*, 17, 4078–4088. doi:10.1111/1462-2920.12972
- Matta, J.L., & Chapman, D.J. (1995). Effects of light, temperature and desiccation on the net emersed productivity of the intertidal macroalga *Colpomenia peregrina* Sauv. (Hamel). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 189, 13–27. doi:10.1016/0022-0981(95)00005-C
- Molenaar, F.J., & Breeman, A.M. (1994). Ecotypic variation in *Phyllophora pseudoceranoides* (Rhodophyta) ensures winter reproduction throughout its geographic range. *Journal of Phycology*, 30, 392–402. doi:10.1111/j.0022-3646.1994.00392.x
- Molenaar, F.J., & Breeman, A.M. (1997). Latitudinal trends in the growth and reproductive seasonality of *Delesseria sanguinea*, *Membranoptera alata*, and *Phycodryis rubens* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 33, 330–343. doi:10.1111/j.0022-3646.1997.00330.x

- Moss, B.L. (1982). The control of epiphytes by *Halidrys siliquosa* (L.) Lyngb. (Phaeophyta, Cystoseiraceae). *Phycologia*, *21*, 185–188. doi:10.2216/i0031-8884-21-2-185.1
- Munda, I.M. (1978). Salinity dependent distribution of benthic algae in estuarine areas of Icelandic fjords. *Botanica Marina*, *21*, 451–468. doi:10.1515/botm.1978.21.7.451
- Naldi, M., & Wheeler, P.A. (1999). Changes in nitrogen pools in *Ulva fenestrata* (Chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta) under nitrate and ammonium enrichment. *Journal of Phycology*, *35*, 70–77. doi:10.1046/j.1529-8817.1999.3510070.x
- Nielsen, H.D., Brownlee, C., Coelho, S.M., & Brown, M.M. (2003). Inter-population differences in inherited copper tolerance involve photosynthetic adaptation and exclusion mechanisms in *Fucus serratus*. *New Phytologist*, *160*, 157–165. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00864.x
- Nriagu, J.O. (1990). Global metal pollution - Poisoning the biosphere? *Environment*, *32*, 7–33. doi:10.1080/00139157.1990.9929037
- Ody, A., Thibaut, T., Berline, L., Changeux, T., André, J.-M., Chevalier, C., ..., & Ménard, F. (2019) From *in situ* to satellite observations of pelagic *Sargassum* distribution and aggregation in the Tropical North Atlantic Ocean. *PlosOne* (in press)
- Öquist, G., & Fork, D.C. (1982). Effects of desiccation on the excitation energy distribution from phycoerythrin to the two photosystems in the red alga *Porphyra perforata*. *Physiologia Plantarum*, *56*, 56–62. doi:10.1111/j.1399-3054.1982.tb04899.x
- Oren, A., & Gunde-Cimerman, N. (2007). Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiology Letters*, *269*, 1–10. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00650.x
- Oviatt, C.A., Huizenga, K., Rogers, C.S., & Miller, W.J. (2019). What nutrient sources support anomalous growth and the recent sargassum mass stranding on Caribbean beaches? A review. *Marine Pollution Bulletin*, *145*, 517–525. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.06.049
- Pakker, H., Martins, R.S.T., Boelen, P., Buma, A.G.J., Nikaido, O., & Breeman, A.M. (2000). Effects of temperature on the photoreactivation of ultraviolet-B-induced DNA damage in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, *36*, 334–341. doi:10.1046/j.1529-8817.2000.99087.x
- Paul, V.J., & Hay, M.E. (1986). Seaweed susceptibility to herbivory: chemical and morphological correlates. *Marine Ecology Progress Series*, *33*, 255–264.
- Pavia, H., Cervin, G., Lindgren, A., & Åberg, P. (1997). Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series*, *157*, 139–146. doi:10.3354/meps157139
- Pedersen, M.F., & Borum, J. (1996). Nutrient control of algal growth in estuarine waters. Nutrient limitation and the importance of nitrogen requirements and nitrogen storage among phytoplankton and species of macroalgae. *Marine Ecology Progress Series*, *142*, 261–272. doi:10.3354/meps142261
- Pereira, T.R., Engelen, A.H., Pearson, G.A., Valero, M., & Serrão, E.A. (2015). Response of kelps from different latitudes to consecutive heat shock. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *463*, 57–62. doi:10.1016/j.jembe.2014.10.022
- Pereira, R., Kraemer, G., Yarish, C., & Sousa-Pinto, I. (2008). Nitrogen uptake by gametophytes of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) under controlled-culture conditions. *European Journal of Phycology*, *43*, 107–118. doi:10.1080/09670260701763393
- Peters, A.F., & Schaffelke, B. (1996). *Streblonema* (Ectocarpales, Phaeophyceae) infection in the kelp *Laminaria saccharina* (Laminariales, Phaeophyceae) in the western Baltic. *Hydrobiologia*, *326*, 111–116. doi:10.1007/BF00047795

- Phillips, J.C., & Hurd, C.L. (2003). Nitrogen ecophysiology of intertidal seaweeds from New Zealand: N uptake, storage and utilisation in relation to shore position and season. *Marine Ecology Progress Series*, 265, 31-48. doi:10.3354/meps264031
- Plouguerné, E., Georgantea, P., Ioannou, E., Vagias, C., Roussis, V., Hellio, C., ... & Stiger-Pouvreau, V. (2010). Anti-microfouling activity of lipidic metabolites from the invasive brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Marine Biotechnology*, 12, 52-61. doi:10.1007/s10126-009-9199-9
- Plouguerné, E., Hellio, C., Deslandes, E., Véron, B., Bremer, G., & Stiger-Pouvreau, V. (2008). Anti micro-fouling activities of extracts of two of invasive algae: *Grateloupia turuturu* and *Sargassum muticum*. *Botanica Marina*, 51, 202-208. doi:10.1515/BOT.2008.026
- Plouguerné, E., Kikuchi, H., Oshima, Y., Deslandes, E., & Stiger-Pouvreau, V. (2006a). Isolation of Cholest-5-en-3-ol formate from the red alga *Grateloupia turuturu* Yamada and its chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, 714-717. doi:10.1016/j.bse.2006.04.003
- Plouguerné, E., Le Lann, K., Connan, S., Jechoux, G., Deslandes, E., & Stiger-Pouvreau, V. (2006b). Spatial and seasonal variation in density, reproductive status, length and phenolic content of the invasive brown macroalga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt along the coast of Western Brittany (France). *Aquatic Botany*, 85, 337-344. doi:10.1016/j.aquabot.2006.06.011
- Potin, P. (2012). Intimate associations between epiphytes, endophytes, and parasites of seaweeds. In Wiencke, C., & Bischof, K. (Eds.), *Seaweed biology* (pp. 203-234). Springer.
- Ramlov, F., Souza, J. M. C., Faria, A. V. F., Maraschin, M., Horta, P. A., & Yokoya, N. S. (2011). Growth and accumulation of carotenoids and nitrogen compounds in *Gracilaria domingensis* (Kütz.) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta) cultured under different irradiance and nutrient levels. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21, 255-261. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000081>
- Ramus, J., Beale, S.I., Mauzerall, D., & Howard, K.L. (1976). Changes in photosynthetic pigment concentration in seaweeds as a function of water depth. *Marine Biology*, 37, 223-229. doi:10.1007/BF00387607
- Rastogi, R.P., Sinha, R.P., Singh, S.P., & Häder, D.P. (2010). Photoprotective compounds from marine organisms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 537-558. doi:10.1007/s10295-010-0718-5.
- Reed, R.H., Collins, J.C., & Russell, G. (1980). The effects of salinity upon galactosyl-glycerol content and concentration of the marine red alga *Porphyra perforata* (Roth) C. Ag. *Journal of Experimental Botany*, 31, 1539-1554. doi:10.1093/jxb/31.6.1539
- Reed, R.H. (1983). The osmotic responses of *Polysiphonia lanosa* (L.) Tandy from marine and estuarine sites: evidence for incomplete recovery of turgor. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 68, 169-170.
- Reed, R.H. (1990). Solute accumulation and osmotic adjustment. In Cole, K.M., & Sheath, R.G. (Eds.), *Biology of the Red Algae* (pp. 147-170). Cambridge University Press, Cambridge.
- Reed, R.H., Davison, I.R., Chudek, J.A., & Foster, R. (1985). The osmotic role of mannitol in the Phaeophyta: an appraisal. *Phycologia*, 24, 35-47. doi:10.2216/i0031-8884-24-1-35.1
- Rohde, S., & Wahl, M. (2008). Antifeeding defense in baltic macroalgae: induction by direct grazing versus waterborne cues. *Journal of phycology*, 44, 85-90.
- Rindi, F., & Guiry, M.D. (2004). Composition and spatio temporal variability of the epiphytic macroalgal assemblage of *Fucus vesiculosus* Linnaeus at Clare Island, Mayo, western Ireland. *Journal of experimental marine Biology and Ecology*, 311, 233-252. doi:10.1016/j.jembe.2004.05.009
- Ritter, A., Cabioch, L., Brillet-Guéguen, L., Corre, E., Cosse, A., Darteville, L., ... & Leblanc, C. (2017). Herbivore-induced chemical

- and molecular responses of the kelps *Laminaria digitata* and *Lessonia spicata*. *PLoS ONE*, *12*, e0173315. doi:10.1371/journal.pone.0173315
- Ritter, A., Goulitquer, S., Salaün, J.-P., Tonon, T., Correa, J.A., & Potin, P. (2008). Copper stress induces biosynthesis of octadecanoid and eicosanoid oxygenated derivatives in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *New Phytologist*, *180*, 809–821. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02626.x.
- Rönnerberg, O., & Ruokolahti, C. (1986). Seasonal variation of algal epiphytes and phenolic content of *Fucus vesiculosus* in a northern Baltic archipelago. *Finnish Zoological and Botanical Publishing Board*, *23*, 317–323.
- Rothäusler, E., Gómez, I., Karsten, U., Tala, F., & Thiel, M. (2011). Physiological acclimation of floating *Macrocystis pyrifera* to temperature and irradiance ensures long-term persistence at the sea surface at mid-latitudes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *405*, 33–41. doi:10.1016/j.jembe.2011.05.018
- Sampath-Wiley, P., Neefus, C.D., & Jahnke, L.S. (2008). Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: Fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützinger (Rhodophyta, Bangiales). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *361*, 83–91. doi:10.1016/j.jembe.2008.05.001
- Sand-Jensen, K. (1977). Effect of epiphytes on eelgrass photosynthesis. *Aquatic Botany*, *3*, 55–63. doi:10.1016/0304-3770(77)90004-3
- Savitch, L.V., Maxwell, D.P., & Huner, N. (1996). Photosystem II excitation pressure and photosynthetic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology*, *111*, 127–136. doi:10.1104/pp.111.1.127
- Schagerl, M., & Möstl, M. (2011). Drought stress, rain and recovery of the intertidal seaweed *Fucus spiralis*. *Marine Biology*, *158*, 2471–2479. doi:10.1007/s00227-011-1748-x
- Schmidt, É.C., Maraschin, M., & Bouzon, Z.L. (2010). Effects of UVB radiation on the carragenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales): changes in ultrastructure, growth, and photosynthetic pigments. *Hydrobiologia*, *649*, 171–182. doi:10.1007/s10750-010-0243-6
- Schmitt, T.M., Hay, M.E., & Lindquist, N. (1995). Constraints on chemically mediated coevolution: multiple functions for seaweed secondary metabolites. *Ecology*, *76*, 107–123. doi:10.2307/1940635
- Schoenrock, K.M., Amsler, C.D., McClintock, J.B., & Baker, B.J. (2013). Endophyte presence as a potential stressor on growth and survival in Antarctic macroalgal hosts. *Phycologia*, *52*, 595–599. doi:10.2216/13-188.1
- Schoenwaelder, M.E. (2002). The occurrence and cellular significance of physodes in brown algae. *Phycologia*, *41*, 125–139. doi:10.2216/i0031-8884-41-2-125.1
- Schubert, H., Feuerpfeil, P., Marquardt, R., Telesh, I., & Skarlato, S. (2011). Macroalgal diversity along the Baltic Sea salinity gradient challenges Remane's species-minimum concept. *Marine Pollution Bulletin*, *62*, 1948–1956. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.06.033
- Schubert, N., García-Mendoza, E., & Pacheco-Ruiz, I. (2006). Carotenoids composition of marine red algae. *Journal of Phycology*, *42*, 1208–1216. doi:10.1111/j.1529-8817.2006.00274.x
- Simon-Colin, C., Bessieres, M.-A., & Deslandes, E. (2002). An alternative HPLC method for the quantification of floridoside in salt-stressed cultures of the red alga *Grateloupia doryphora*. *Journal of Applied Phycology*, *14*, 123–127. doi:10.1023/A:1019539225950
- Sinha, R.P., Singh, S.P., & Häder, D.P. (2007). Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *89*, 29–35. doi:10.1016/j.jphotobiol.2007.07.006.
- Steneck, R.S., Graham, M.H., Bourque, B.J., Corbett, D., Erlandson, J.M., Estes, J.A., & Tegner,

- M.J. (2002). Kelp forest ecosystems: biodiversity, stability, resilience and future. *Environmental Conservation*, 29, 436–459. doi:10.1017/S0376892902000322
- Stengel, D.B., Connan, S., & Popper, Z.A. (2011). Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*, 29, 483–501. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.016
- Stengel, D. & Dring, M. (1997). Morphology and in situ growth rates of plants of *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyta) from different shore levels and responses of plants to vertical transplantation. *European Journal of Phycology*, 32, 193–202. doi:10.1080/09670269710001737129
- Stewart, H.L., & Carpenter, R.C. (2003). The effects of morphology and water flow on photosynthesis of marine macroalgae. *Ecology*, 84, 2999–3012. doi:10.1890/02-0092
- Stiger-Pouvreau, V., Bourgougnon, N., & Deslandes, E. (2016). Carbohydrates from seaweeds. In Fleurence, J., & Levine, I. (Eds.), *Seaweed in Health and Disease Prevention* (pp. 223-274). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-802772-1.00008-7
- Stiger-Pouvreau, V., & Guérard, F. (2018). Bio-inspired molecules extracted from marine macroalgae: a new generation of active ingredients for cosmetics and human health. In La Barre, S., & Bates, S.S. (Eds.), *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules, Part 2: Marine molecules for disease treatment/prevention and for biological research* (pp. 709-746). ISBN: 978-3-527-34138-2
- Stratil, S.B., Neulinger, S.C., Knecht, H., Friedrichs, A.K., & Wahl, M. (2014). Salinity affects compositional traits of epibacterial communities on the brown macroalga *Fucus vesiculosus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 88, 272–279. doi:10.1111/1574-6941.12292
- Surget, G., Le Lann, K., Delebecq, G., Kervarec, N., Donval, A., Poullaouec, M.-A., ... Stiger-Pouvreau, V. (2017). Seasonal phenology and metabolomics of the introduced red macroalga *Gracilaria vermiculophylla*, monitored in the Bay of Brest (France). *Journal of Applied Phycology*, 29, 2651–2666. doi:10.1007/s10811-017-1060-3
- Szalontai, B., Nishiyama, Y., Gombos, Z., & Murata, N. (2000). Membrane dynamics as seen by Fourier transform infrared spectroscopy in a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. The effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 1509, 409–419. doi:10.1016/s0005-2736(00)00323-0
- Takaichi, S. (2011). Carotenoids in Algae: distribution, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, 9, 1101–1118. doi:10.3390/md9061101
- Tanniou, A. (2014) Etude de la production de biomolécules d'intérêt (phlorotannins, pigments, lipides) d'algues brunes modèles par des approches combinées de profilage métabolique et d'écophysiologie. [Study of the production of biomolecules of interest (phlorotannins, pigments, lipids) of brown algal models by combined metabolic profiling and ecophysiology approaches]. PhD, Université de Bretagne Occidentale, France.
- Teichberg, M., Martinetto, P., & Fox, S.E. (2012). Bottom-Up Versus Top-Down Control of Macroalgal Blooms. In Wiencke, C., & Bischof, K. (Eds.), *Seaweed Biology* (pp. 449–467). Springer, Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-28451-9_21
- Torres, P.B., Chow, F., & Santos, D.Y.A.C. (2015). Growth and photosynthetic pigments of *Gracilariopsis tenuifrons* (Rhodophyta, Gracilariaceae) under high light *in vitro* culture. *Journal of Applied Phycology*, 27, 1243–1251. doi:10.1007/s10811-014-0418-z
- Toth, G.B., & Pavia, H. (2000). Water-borne cues induce chemical defense in a marine alga (*Ascophyllum nodosum*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 14418–14420. Doi:10.1073/pnas.250226997
- Ursi, S., Pedersén, M., Plastino, E., & Snoeijs, P. (2003). Intraspecific variation of photosynthesis,

- respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). *Marine Biology*, 142, 997–1007. doi:10.1007/s00227-003-1031-x
- van den Hoek, C. (1984). World-wide latitudinal and longitudinal seaweed distribution patterns and their possible causes, as illustrated by the distribution of Rhodophyta genera. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 38, 227. doi:10.1007/BF01997483
- van de Poll, W.H., Eggert, A., Buma, A.G.J., & Breeman, A.M. (2001). Effects of UV-B-induced DNA damage and photoinhibition on growth of temperate marine red macrophytes: habitat related differences in UV-B tolerance. *Journal of Phycology*, 37, 30–37. doi:10.1046/j.1529-8817.2001.037001030.x
- Vanitha, A., & Chandra, S. (2012). Studies on photosynthetic pigments of some red algae of Covelong, Chennai (India). *International Journal of Current Science*, 149–154.
- Wahl, M., Goecke, F., Labes, A., Dobretsov, S., & Weinberger, F. (2012). The second skin: ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms. *Frontiers in Microbiology*, 3, 292. doi:10.3389/fmicb.2012.00292
- Wahl, M., Hay, M.E., & Enderlein, P. (1997). Effects of epibiosis on consumer-prey interactions. *Hydrobiologia*, 355, 49–59
- Wallentinus, I. (1984). Comparisons of nutrient uptake rates for baltic macroalgae with different thallus morphologies. *Marine Biology*, 80, 215–225. doi:10.1007/BF02180189
- Walther, G.-R. (2010). Community and ecosystem responses to recent climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Biological Sciences*, 365, 2019–2024. doi:10.1098/rstb.2010.0021
- Weinberger, F. & Friedlander, M. (2000). Response of *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) to oligogars results in defense against agar-degrading epiphytes. *Journal of Phycology*, 36, 1079–1086. doi:10.1046/j.1529-8817.2000.00003.x
- Weinberger, F., Pohnert, G., Berndt, M.L., Bouarab, K., Kloareg, B., & Potin, P. (2005). Apoplastic oxidation of L-asparagine is involved in the control of the green algal endophyte *Acrochaete operculata* Correa & Nielsen by the red seaweed *Chondrus crispus* Stackhouse. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1317–1326. doi:10.1093/jxb/eri132
- Weinberger, F., Beltran, J., Correa, J.A., Lion, U., Pohnert, G., Kumar, N., ... Potin, P. (2007). Spore release in *Acrochaetium* sp. (Rhodophyta) is bacterially controlled. *Journal of Phycology*, 43, 235–241. doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00329.x
- Weinberger, F., Rohde, S., Oschmann, Y., Shahnaz, L., Dobretsov, S., & Wahl, M. (2011). Effects of limitation stress and of disruptive stress on induced antigrazing defense in the bladder wrack *Fucus vesiculosus*. *Marine Ecology Progress Series*, 427, 83–94.
- Wheeler, W.N. (1980). Effect of boundary layer transport on the fixation of carbon by the giant kelp *Macrocystis pyrifera*. *Marine Biology*, 56, 103–110. doi:10.1007/BF00397128
- Whittick, A. (1983). Spatial and temporal distributions of dominant epiphytes on the stipes of *Laminaria hyperborea* (Gunn.) Fosl. (Phaeophyta: Laminariales) in S.E. Scotland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 73, 1–10. doi:10.1016/0022-0981(83)90002-3
- Wiencke, C., Gómez, I., Pakker, H., Flores-Moya, A., Altamirano, M., Hanelt, D., ... Figueroa, F.L. (2000). Impact of UV-radiation on viability, photosynthetic characteristics and DNA of brown algal zoospores: implications for depth zonation. *Marine Ecology Progress Series*, 197, 217–229. doi:10.3354/meps197217
- Wright, J.T., de Nys, R., Poore, A.G.B., & Steinberg, P.D. (2004). Chemical defense in a marine alga: Heritability and the potential for selection by herbivores. *Ecology*, 85, 2946–2959. doi:10.1890/03-4041
- Wright, P.J., & Reed, R.H. (1985). The effects of osmotic stress on intracellular hexitols in the

marine brown alga *Himantalia elongata* (L.) S.F. Gray. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 93, 183-190. doi:10.1016/0022-0981(85)90158-3

Yakovleva, I.M., & Titlyanov, E.A. (2001). Effect of high visible and UV irradiance on subtidal *Chondrus crispus*: stress, photoinhibition and protective mechanisms. *Aquatic Botany*, 71, 47-61. doi:10.1016/S0304-3770(01)00167-X

Yarish, C., Breeman, A.M., & van den Hoek, C. (1986). Survival strategies and temperature responses of seaweeds belonging to different biogeographic distribution groups. *Botanica Marina*, 29, 215-230. doi:10.1515/botm.1986.29.3.215

Yebra, D.M., Kiil, S., & Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and

environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50, 75-104. doi:10.1016/j.porgcoat.2003.06.001

Young, A.J., & Frank, H.A. (1996). Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 36, 3-15. doi:10.1016/S1011-1344(96)07397-6.

Zaneveld, J.S. (1969). Factors controlling the delimitation of littoral benthic marine algal zonation. *American Zoologist*, 9, 367-391. doi:10.1093/icb/9.2.367

Zou, D., & Gao, K. (2002). Effects of desiccation and CO₂ concentrations on emerged photosynthesis in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta), a species farmed in China. *European Journal of Phycology*, 37, 587-592. doi:10.1017/S0967026202003876

Titre : Composés phénoliques d'algues brunes bretonnes : de la ressource algale à leur extraction éco-responsable et caractérisation chimique jusqu'à leur formulation en cosmétique

Mots clés : algues brunes, extraction éco-responsable, composés phénoliques, cosmétique

Résumé : La recherche de molécules naturelles dans de nombreux domaines industriels se développe dans une optique d'éco-responsabilité, notamment en cosmétique. Les macroalgues sont une ressource intéressante, riche en de nombreux métabolites tels que les composés phénoliques qui présentent des activités photoprotectrices, antioxydantes ou encore anti-âge. L'objectif de ce travail de thèse était d'analyser les algues brunes bretonnes en termes de composés phénoliques au stade précoce ou au stade macroscopique, obtenir des fractions enrichies en composés phénoliques actifs, les identifier et les inclure dans des formulations cosmétiques. Les résultats de ces travaux ont montré des teneurs élevées en composés phénoliques notamment chez les Fucales et une variation saisonnière de leur teneur pouvant varier selon les espèces.

Cette étude a montré que les méthodes alternatives éco-responsables d'extraction et de purification des composés phénoliques permettent d'obtenir des fractions enrichies en ces composés de manière similaire voire supérieure aux méthodes classiques. D'autre part, une analyse HPLC a permis de séparer nos composés d'intérêt, devant cependant être couplée à une méthode de spectrométrie de masse pour permettre l'identification des composés. Enfin, ce travail a mis en évidence la capacité de valorisation en cosmétique des composés phénoliques par leur activité anti-âge et leur stabilité à l'état sec. Leur stabilité au sein de formulation cosmétique reste à être validée dans différentes galéniques, la stabilité d'une seule ayant été testée dans cette étude.

Title : Phenolic compounds of brown seaweeds from Brittany: from the algal resource, their green extraction and chemical characterization to their formulation in cosmetics.

Keywords : brown seaweeds, green extraction, phenolic compounds, cosmetics

Abstract : The search for natural molecules in many industrial fields is growing with a view to eco-responsibility, particularly in cosmetics. Seaweeds are an interesting resource as being rich in many molecules such as phenolic compounds with photoprotective, antioxidant and antiaging activities. The aim of this PhD was to analyze brown seaweeds from Brittany (France) in terms of phenolic compounds in the early or macroscopic stages, to obtain fractions enriched in active phenolics, to identify them and to include them in cosmetic formulations. The results showed high levels of phenolics, particularly in Fucales, and a seasonal variation in their content according to the species.

This study showed that alternative green extraction and purification of phenolics make it possible to obtain fractions enriched in these compounds in a similar or even superior way to conventional methods. On the other hand, an HPLC analysis has separated phenolics, which must be combined with a mass spectrometry method to allow the identification of the compounds. This work has highlighted the ability of phenolics to be recovered in cosmetic products by their antiaging activity and their stability in the dry extract. Their stability within cosmetic formulations has yet to be validated in different galenics, as only one galenic has been tested in this study.