



**HAL**  
open science

# Extraction et évaluation des propriétés biologiques des ulvanes et oligo-ulvanes de l'algue verte *Ulva* sp. : actions sur le métabolisme de cellules cutanées et sur le microbiote cutané

Mathilde Fournière

## ► To cite this version:

Mathilde Fournière. Extraction et évaluation des propriétés biologiques des ulvanes et oligo-ulvanes de l'algue verte *Ulva* sp. : actions sur le métabolisme de cellules cutanées et sur le microbiote cutané. Biotechnologies. Université de Bretagne Sud, 2021. Français. NNT : 2021LORIS593 . tel-03282651

**HAL Id: tel-03282651**

**<https://theses.hal.science/tel-03282651>**

Submitted on 9 Jul 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 BRETAGNE SUD

ECOLE DOCTORALE N° 598  
Sciences de la Mer et du littoral  
Spécialité : *Biotechnologies*

Par

**Mathilde FOURNIÈRE**

**Extraction et évaluation des propriétés biologiques des ulvanes et oligo-ulvanes de l'algue verte *Ulva* sp. : actions sur le métabolisme de cellules cutanées et sur le microbiote cutané**

Thèse présentée et soutenue à Vannes, le 12 mai 2021

Unité de recherche : Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, UR 3884

Thèse N° : 593

## Rapporteurs avant soutenance :

Céline Laroche    Maître de conférences HDR à l'Université de Clermont-Auvergne  
Laurent Misery    Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale

## Composition du Jury :

Président :	Nathalie Guivarc'h	Professeure à l'Université de Tours
Examineurs :	Marc Feuilloley	Professeur à l'Université de Rouen
	Nathalie Guivarc'h	Professeure à l'Université de Tours
	Céline Laroche	Maître de conférences HDR à l'Université de Clermont-Auvergne
	Laurent Misery	Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale
Dir. de thèse :	Nathalie Bourgougnon	Professeure à l'Université Bretagne Sud
Encadrants :	Gilles Bedoux	Maître de conférences à l'Université Bretagne Sud
	Thomas Latire	Maître de conférences à l'Université Catholique de l'Ouest Bretagne Nord

## Invité

Nicolas Lebonvallet    Ingénieur de recherche HDR à l'Université de Bretagne Occidentale





# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du Jury, Pr. Nathalie Guivarc'h, Dr. Céline Laroche, Pr. Marc Feuilloley et Pr. Laurent Misery, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail. Je remercie particulièrement les Dr. Céline Laroche et Pr. Laurent Misery d'avoir accepté d'en être les rapporteurs.

Je remercie également les Dr. Stéphanie Bordenave-Juchereau et Dr. Nicolas Lebonvallet, d'avoir été les membres de mon Comité de Suivi Individuel de thèse, d'avoir évalué ces travaux à mi-parcours, de m'avoir conseillé et donné des pistes d'orientation de recherche.

Ce travail de thèse a été financé par le Conseil Départemental des Côtes d'Armor (CD22) et par l'Université Catholique de l'Ouest Bretagne Nord. Aussi, je tiens à leur adresser mes remerciements pour le financement nécessaire à la réalisation de ce projet.

Je remercie également le Laboratoire Interactions Épithélium Neurons (LIEN), sous la direction du Pr. Laurent Misery, et notamment Raphaël Leschiera et Nicolas Lebonvallet pour l'obtention des fibroblastes.

Je remercie les Professeures Nathalie Bourgougnon et Isabelle Linossier pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM). Je remercie à nouveau sincèrement le Pr. Nathalie Bourgougnon, Directrice de thèse, et également le Dr. Gilles Bedoux, co-encadrant de thèse, de m'avoir accueillie et intégrée au sein de l'équipe du LBCM à Vannes, et d'avoir contribué à ce travail. Merci Nathalie, pour votre gentillesse, vos relectures et corrections. Merci Gilles, pour vos idées, vos conseils et vos corrections malgré l'emploi du temps plus que surchargé.

Je remercie aussi tous les autres membres du LBCM et plus particulièrement les membres de l'équipe de Vannes. Merci Christel pour ton accueil et ton écoute. Merci Hugo pour ton calme et ta gentillesse, et de m'avoir laissé utiliser le lyoph de nombreuses fois ! Merci également à Shareen et Rexie (Docteurs désormais !), pour les moments partagés dans notre bureau du LBCM. Je remercie également Rhesie, Meezan et Ana (Docteurs aussi !) pour nos discussions en anglais (of course !) et au plaisir de se voir lors d'un voyage en Indonésie et Mexique. J'adresse mes encouragements aux futurs docteurs du LBCM Vannes, Sauvann Paulino et Manon Choulot.

Je tiens à remercier particulièrement le Dr. Thomas Latire, co-encadrant de thèse, de m'avoir encadré et supporté pendant ces trois années. Merci énormément Thomas, pour tout ce que tu m'as appris mais aussi pour ta disponibilité, ton soutien sans faille mais aussi ta rigueur scientifique. Je te remercie aussi pour nos nombreuses discussions dans le laboratoire mais aussi au bureau (partagé !). Merci pour tes nombreuses relectures/corrections qui ont permis d'améliorer ce travail. En bref, tu as été un super encadrant et je souhaite que d'autres thésards vivent cette expérience en ta compagnie !

## Remerciements

---

Je remercie également les membres de l'UCO BN, notamment le Président Patrick Jézéquel, la direction Viviane Le Guilloux, Yann Henry et Sabine Le Goffic mais aussi les membres du Pôle Sciences, Dr. Christine Gable, Dr. Laurence Gordon, Claudie Le Goff, Loanne Le Bars, Dr. Laurent Dabouineau et Dr. Nicolas Marilier pour votre accueil au sein de Guingamp et de l'Université, votre confiance et votre bienveillance. Étant principalement au laboratoire, nous nous sommes surtout croisés au cours de ma thèse mais j'ai apprécié nos (rares) mais sincères échanges. Claudie, merci pour ton aide en culture cellulaire et nos discussions (LMP) autour d'une extraction d'ARN ! Je remercie également Audrey Pla (désormais dans une nouvelle aventure hors UCO) pour nos nombreuses discussions au sein de la laverie et l'optimisme lors de mes recherches infructueuses.

Je tiens, par ailleurs, à remercier chaleureusement le Pr. Marc Feuilloley de m'avoir accueillie dans son équipe au sein du Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) d'Évreux durant la dernière partie de ma thèse. Je le remercie pour sa gentillesse et nos différentes discussions scientifiques. Je souhaite aussi remercier tous les autres membres du LMSM pour leur accueil, leur aide et leur bonne humeur, lors de cette courte mobilité de 3 mois en cette période si particulière de COVID-19. En particulier, merci Djouhar, pour tes enseignements en microbiologie et notamment sur les Cuti (ces gentilles petites bêtes qui n'en font qu'à leur tête !), et bon courage dans la suite de ta thèse.

Je remercie, aussi plus personnellement, Marie et Nolwenn de m'avoir accueillie dans mes débuts au LBCM, de m'avoir supportée et de m'avoir encouragée au cours de cette aventure. Marie, même si nos débuts ont été « difficiles » puisque je suis arrivée au moment de ta rédaction de thèse (je le comprends maintenant que tu n'avais pas le temps !), nous avons après ta soutenance pu réellement apprendre à se connaître et partager de rares mais bons moments avant mon départ dans le Nord de la Bretagne ! Merci également pour ton œil affûté lors des corrections du premier papier soumis qui a contribué à son acceptation. Nous t'attendons avec Christophe pour un week-end avec Nolwenn dans le grand Nord. Nolwenn, merci pour tes conseils scientifiques, ton temps, ton amitié et nos bons moments en Bretagne Sud et Nord désormais (à suivre je l'espère) et aussi pour la relecture de ce manuscrit. Pour reprendre les mots de Marie et que je partage : tu es the « Eye of the tiger ».

Merci à tous mes amis Sablais, toujours disponibles lors de nos retours dans cette magnifique ville des Sables d'Olonne : Julie & Titi (& Ellie la petite dernière), Éléonore & Xavier, Clément, Damien, Jean-Eudes, Thibaud, Cyril, Simon, Jérémie & Fernanda, Maxime & Marie, Auriane et Alexandre.

Merci à mes amies parisiennes pour votre soutien et votre amitié depuis notre rencontre dès la tendre enfance : Gloria, ou au cours de mon long parcours scolaire : Florence, Clarisse, Mariono. Merci aussi à Natacha et Margaux, même si comme l'a dit Margaux dans ses remerciements de thèse nos débuts ont été compliqués à l'ENSAT, vous êtes d'un soutien sans faille, merci de m'accompagner dans les différentes étapes de ma vie. Merci aux autres amies qui ont suivis de près ou de loin cette aventure (Anne, la future maman, Éloïse, Jaja, Annabelle...).

## Remerciements

---

Merci à mes autres amies : Léa, pour ton soutien depuis notre rencontre sous le soleil du Sud il y a 5 ans maintenant ; Hortense, bretonne fraîchement débarquée, pour tes conseils en dernière ligne droite et nos balades/repas en ce dur temps de rédaction.

Merci également à ma belle-famille Christine, Dominique, Louis-Marie et Florène pour les bons week-ends et repas partagés ensemble mais aussi pour vos encouragements et votre aide lors des multiples déménagements/travaux.

Mes remerciements vont bien évidemment à ma famille pour leur amour, leur soutien, leur aide et leur patience. Un immense merci à mes parents, Mireille & Claude, qui m'ont permis d'arriver jusque-là. C'est promis les études s'arrêtent après cela. Un grand merci aussi à mon frère, Maxime, à ma belle-sœur, Chloé et à ma nièce Alma pour les week-ends de décompression. Merci à vous quatre pour les déménagements, les travaux (bon il en reste encore à venir) et tous les bons moments passés ensemble avec du bon vin ! Merci également à mes grands-parents et à toute la famille Fournière-Juhé pour les week-ends normands.

Enfin, Merci à toi, Clément qui me supporte depuis plus de 10 ans maintenant en amitié et depuis 3 ans en amour. Tu es à mes côtés depuis le début de cette longue aventure qui prend désormais fin (et oui c'est enfin arrivé !). Merci pour ton aide et ton soutien au quotidien (l'intendance comme on dit) qui m'ont permis de donner le meilleur de moi-même sur ce projet. Merci d'avoir été aussi un super coworker et pour le support informatique pendant ma rédaction, et de ne pas avoir (trop) joué de batterie pour me déconcentrer ! Je te remercie de m'avoir suivie dans cette thèse itinérante (Vannes > Guingamp > Évreux > Guingamp) et d'avoir géré les nombreux déménagements et travaux (15 j c'était peut-être un peu ambitieux pour refaire un appartement) ! Merci pour tout l'amour que tu me portes et ton soutien sans faille à toutes les épreuves : tu es mon meilleur soutien ! Merci aussi pour tous les moments et les projets que l'on partage mais aussi pour tous les prochains à venir (voyages, immobiliers, ...). Je te promets maintenant plein de pâtisseries (avec tout le matériel que j'ai !) qui égayeront tes papilles je l'espère. P.S. : Nous sommes bretons depuis trois ans, et j'attends toujours mon Krampouz !



# Productions scientifiques

## Publications

**Fournière, M.** ; Bedoux, G. ; Lebonvallet, N. ; Leschiera, R. ; Le Goff-Pain, C. ; Bourgougnon, N. ; Latire, T. Poly- and Oligosaccharide *Ulva* sp. Fractions from Enzyme-Assisted Extraction Modulate the Metabolism of Extracellular Matrix in Human Skin Fibroblasts: Potential in Anti-Ageing Dermo-Cosmetic Applications. *Marine Drugs*, **2021**, *19*, 156. (IF : 4,073)

**Fournière, M.** ; Latire, T. ; Souak, D. ; Feuilloley, M.G.J. ; Bedoux, G. *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*: Two Major Sentinels of Skin Microbiota and the Influence of Cosmetics. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1752. (IF : 4,152)

**Fournière, M.** ; Latire, T. ; Lang, M. ; Terme, N. ; Bourgougnon, N. ; Bedoux, G. Production of Active Poly- and Oligosaccharidic Fractions from *Ulva* sp. by Combining Enzyme-Assisted Extraction (EAE) and Depolymerization. *Metabolites* **2019**, *9*, 182. (IF : 3,303)

## Chapitre d'ouvrage

Terme, N. ; Chénais, B. ; **Fournière, M.** ; Bourgougnon, N. ; Bedoux, G. (2019). « Chapter 15: Algal derived functional lipids and their role in promoting health », in *Recent Advancements in Micro and Macroalgal Processing: Food and Health Perspectives* Wiley, ISBN: 9781119542582.

## Communications orales

**Fournière, M.** ; Bedoux, G. ; Bourgougnon, N. ; Lebonvallet, N. ; Latire, T. « Production of Poly- and Oligosaccharidic Fractions from Macroalga *Ulva* sp.: Regulation of Extracellular Matrix Renewal in Human Skin Fibroblasts ». 7<sup>th</sup> Conference of the International Society for Applied Phycology, initialement prévu 19-24 avril 2020 (COVID19), reprogrammé en ligne du 14 mai au 13 août 2021. Abstract accepté.

**Fournière, M.** ; Latire, T. ; Lebonvallet, N. ; Bourgougnon, N. ; Bedoux, G. « Production d'ingrédients actifs par dépolymérisation des ulvanes ». GDR Cosm'actifs, Vannes, 23-24 mai 2019.

**Fournière, M.** ; Latire, T. ; Bourgougnon, N. ; Bedoux, G. « Étude des propriétés biologiques d'extraits ou molécules de deux algues prolifératives *Ulva* sp. et *Solieria chordalis* sur le métabolisme de cellules cutanées et le microbiote cutané : applications potentielles en cosmétique ». 3<sup>ème</sup> assises Recherche & Innovation, Saint-Brieuc, 23 novembre 2018.

**Fournière, M.** ; Latire, T. ; Lebonvallet, N. ; Bourgougnon, N. ; Bedoux, G. « Macroalgues et production d'actifs cosmétiques ». Journée de la Société Phycologique de France, Paris, 5 novembre 2018.

**Fournière, M.** ; Latire, T. ; Lebonvallet, N. ; Bourgougnon, N. ; Bedoux, G. « Production d'ingrédients cosmétiques actifs et fonctionnels à partir de macroalgues ». GDR Cosm'actifs, Rennes, 27 et 28 septembre 2018.

## **Communications par poster**

**Fournière, M.** ; Latire, T. ; Lebonvallet, N. ; Bourgougnon, N. ; Bedoux, G. « Ulvan extracts and its dermo-cosmetic applications : promotion of fibroblasts proliferation and balance skin-microbiota ». COSM'ING 2018, Saint-Malo, 4-6 juillet 2018.

# Activités complémentaires

## Participation aux Doctoriales

Mai 2019, Rennes, France.

## Activités d'enseignement

Vacations sur l'année 2018/2019 : 61 h d'enseignement au total en Licence 3 Professionnelle Développement des produits cosmétiques et de santé et Licence 2 Sciences de la Vie et de la Terre :

- TP Formulation cosmétique de Licence Professionnelle Développement des produits cosmétiques et de santé (4 h équivalent TD en Octobre 2018).
- TP Biologie végétale en Licence 2<sup>ème</sup> année de Licence Sciences de la Vie et de la Terre (48 h équivalent TD en Novembre et Décembre 2018).
- Encadrement projet tuteuré de deux étudiantes de stages Licence Professionnelle Développement des produits cosmétiques et de santé (5 h équivalent TD en Février 2019).
- Suivis et évaluations de stages de Licence Professionnelle Développement des produits cosmétiques et de santé (4 h équivalent TD en Juin 2019).





# **Table des matières**



# Table des matières

Liste des abréviations et symboles	19
Liste des figures	27
Liste des tableaux	33
Avant-propos	37
Chapitre 1 : Revue de la littérature	43
<b>I. Les macroalgues : sources de polysaccharides bioactifs - focus sur <i>Ulva</i> sp. et les ulvanes</b>	<b>43</b>
A. Généralités sur les macroalgues et l'algue d'étude <i>Ulva</i> sp.	43
1. Définitions et écologie des macroalgues	43
2. Histoire, distribution et reproduction de l'algue verte <i>Ulva</i> sp.	44
3. Morphologie de l'algue <i>Ulva</i> sp.	46
4. Les marées vertes en Bretagne	47
B. Les macroalgues : sources de polysaccharides	49
1. Composition générale en métabolites primaires	49
2. Les polysaccharides des macroalgues	50
3. Les ulvanes : polysaccharides pariétaux majoritaires d' <i>Ulva</i> sp.	57
C. Les polysaccharides algaux : composés bioactifs	66
1. Activités biologiques des ulvanes sur la santé humaine : relation structure/fonction	67
2. Activités biologiques de polysaccharides algaux sur le système cutané : applications en dermo-cosmétique	68
<b>II. Le système cutané : structure et rôle</b>	<b>80</b>
A. Focus sur l'épiderme et le derme cutané	81
1. L'épiderme	81
2. Le derme	83
B. La matrice extracellulaire du derme	86
1. L'élastine	86
2. Les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes	87
3. Les collagènes	89
4. Focus sur le collagène de type I	91
5. Les enzymes du catabolisme matriciel et leurs inhibiteurs : remodelage de la MEC	97
C. La modulation du système cutané	101
1. La cicatrisation cutanée	101
2. La sclérodermie	104
3. Le vieillissement cutané	106

<b>III. Le microbiote cutané</b>	<b>110</b>
A. Composition du microbiote cutané	110
B. <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Cutibacterium acnes</i> : trois bactéries majeures du microbiote cutané	111
1. Distribution corporelle de <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> et <i>C. acnes</i>	111
2. Trois bactéries à Gram positif	113
3. Mécanismes d'adhésion de <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> et <i>C. acnes</i> au système cutané	115
C. Commensalisme de <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> et <i>C. acnes</i> avec le système cutané	116
1. Inhibition directe de la croissance des pathogènes	116
2. Stimulation du système immunitaire inné	117
D. Passage du commensalisme à la pathogénicité opportuniste de <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> et <i>C. acnes</i> : formation de biofilms et corrélation avec des dysbioses cutanées courantes	120
1. Biofilm de <i>C. acnes</i> et perte de diversité des phylotypes : implication dans l'acné	121
2. Biofilm et perte de diversité de <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i> : implication dans la dermatite atopique	124
<b>Objectifs de thèse</b>	<b>131</b>
<b>Chapitre 2 : Matériels et méthodes</b>	<b>135</b>
<b>I. Récolte, extraction, purification et dépolymérisation de la matière algale <i>Ulva</i> sp.</b>	<b>135</b>
A. Collecte et traitement d' <i>Ulva</i> sp.	135
B. Procédés d'extraction et de purification des ulvanes	135
1. Protocoles d'extraction et de précipitation des ulvanes	135
2. Procédés de purification des ulvanes	136
3. Comparaison de deux procédés de dépolymérisation des ulvanes	139
<b>II. Méthodes d'analyses de la composition biochimique</b>	<b>140</b>
A. Analyse de la composition biochimique par dosages	140
1. Détermination du taux de matière minérale	140
2. Extractions préliminaires à l'acide et à l'eau	140
3. Dosage colorimétrique des groupements sulfates	140
4. Dosage colorimétrique des sucres totaux	141
5. Dosage colorimétrique des acides uroniques	142
6. Dosage colorimétrique des protéines	143
B. Analyses par systèmes chromatographiques et spectrométriques	144
1. Profil des monosaccharides déterminé par Chromatographie Haute Performance Échangeuse d'Anions couplée à un Détecteur par Ampérométrie Pulsée (HPAEC-PAD)	144
2. Profil des poids moléculaires des polysaccharides par Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance (HPSEC)	145
3. Spectrométrie de masse couplant source d'ionisation laser assistée par matrice et analyseur à temps de vol (MALDI-TOF)	146

<b>III. Évaluation d'activités biologiques <i>in vitro</i> par des tests biochimiques</b>	<b>146</b>
A. Activité antiradicalaire : test DPPH	146
B. Activité anti-vieillessement : test d'inhibition de l'élastase	147
C. Activité anti-inflammatoire : test d'inhibition de la lipoxigénase	148
<b>IV. Évaluation d'activités biologiques <i>in vitro</i> sur fibroblastes dermiques humains</b>	<b>149</b>
A. La culture cellulaire	149
1. Obtention des fibroblastes	149
2. Amplification des fibroblastes	150
B. Évaluation de la prolifération et de la cytotoxicité cellulaire	150
1. Mesure de la prolifération cellulaire par le test WST-1	150
2. Mesure de la cytotoxicité par le test de la lactate déshydrogénase (LDH)	151
C. Mise en évidence du collagène total : coloration au rouge Sirius	152
D. Mise en évidence des glycosaminoglycanes : coloration au bleu alcian	153
E. Mesures protéiques : Enzyme-linked immunosorbent assay et Western Blot	153
1. Extraction des protéines cellulaires	153
2. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	154
3. Western Blot	154
F. Mesure de l'activité enzymatique de la MMP-1 par zymographie	156
G. Quantification des ARNm	157
1. Extraction des ARN totaux	157
2. Synthèse d'ADNc à partir d'ARNm et RT-qPCR	157
<b>V. Évaluation d'activités biologiques <i>in vitro</i> sur des bactéries du microbiote cutané</b>	<b>159</b>
A. Souches bactériennes et culture	159
1. Souches d'étude : <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Cutibacterium acnes</i>	159
2. Milieux de culture	159
3. Conditions de pré-culture solides et liquides	160
4. Préparation des fractions testées	160
B. Suivi de croissance bactérienne	160
C. Étude de la formation de biofilm par microscopie confocale à balayage laser	161
D. Étude de la cytotoxicité de <i>S. epidermidis</i> et <i>S. aureus</i> et du potentiel inflammatoire de <i>C. acnes</i> sur les kératinocytes	162
1. Culture des kératinocytes	162
2. Infection des cellules	162
3. Mesure de la cytotoxicité par le test de la LDH	163
4. Mesure du potentiel inflammatoire par dosage de l'IL-8	163
<b>VI. Analyses statistiques</b>	<b>164</b>

## Chapitre 3 : Extraction, purification et dépolymérisation d'ulvanes de la macroalgue *Ulva* sp. et tests d'activités biologiques 167

<b>I. Introduction</b>	<b>167</b>
<b>II. Résultats</b>	<b>168</b>
A. Extraction et purification des ulvanes : production de fractions d'ulvanes	168
1. Rendements d'extraction des ulvanes et taux de recouvrement après purification	168
2. Caractérisation biochimique et monosaccharidique des ulvanes bruts et purifiés	170
B. Dépolymérisation des ulvanes : production de fractions d'oligo-ulvanes	173
1. Suivi de la dépolymérisation par Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance (HPSEC)	173
2. Rendements de production des fractions d'oligo-ulvanes	176
3. Caractérisation biochimique et monosaccharidique des fractions d'oligo-ulvanes	177
4. Spectrométrie de masse MALDI-TOF	178
C. Évaluation d'activités biologiques des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes par des tests biochimiques	180
1. Évaluation de la capacité de piégeage des radicaux libres : activité antiradicalaire	180
2. Évaluation de la capacité d'inhibition de l'élastase : activité anti-vieillessement	180
3. Évaluation de la capacité d'inhibition de la lipoxigénase : activité anti-inflammatoire	181
<b>III. Conclusions</b>	<b>182</b>

## Chapitre 4 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de la macroalgue *Ulva* sp. sur le métabolisme matriciel de fibroblastes dermiques humains en culture 187

<b>I. Introduction</b>	<b>187</b>
<b>II. Résultats</b>	<b>189</b>
A. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur les activités cellulaires des fibroblastes en culture	189
1. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la prolifération des fibroblastes	189
2. Évaluation de la cytotoxicité potentielle des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur les fibroblastes en culture	193
B. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression et la synthèse de composants de la matrice extracellulaire des fibroblastes	194
1. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la synthèse de collagène total	194
2. Régulation de l'expression des collagènes de type I et III de la MEC par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes	196
3. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la synthèse de GAG sulfatés et non sulfatés	202

## Table des matières

C.	Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression et l'activité de la MMP-1 et du TIMP-1 des fibroblastes	205
1.	Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression, la néosynthèse par les fibroblastes et l'activité de la MMP-1	205
2.	Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression et la néosynthèse du TIMP-1 par les fibroblastes	208
D.	Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression du <i>TGF-β</i> , des <i>SMAD</i> et de la sous-unité <i>p65</i> de NF-κB	211
1.	Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur le niveau d'expression des ARNm de <i>TGF-β1</i>	212
2.	Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur le niveau d'expression des ARNm de <i>SMAD2</i> , <i>SMAD3</i> et <i>SMAD4</i>	213
3.	Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur le niveau d'expression des ARNm de la sous-unité <i>p65</i> de NF-κB	214
<b>III.</b>	<b>Conclusions</b>	<b>215</b>
<b>Chapitre 5 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de la macroalgue <i>Ulva</i> sp. par EAE sur des bactéries du microbiote cutané</b>		<b>221</b>
<b>I.</b>	<b>Introduction</b>	<b>221</b>
<b>II.</b>	<b>Résultats</b>	<b>223</b>
A.	Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la croissance bactérienne	223
1.	Effets sur la croissance de staphylocoques commensaux cutanés : <i>S. epidermidis</i> MFP04 et <i>S. aureus</i> MFP03	223
2.	Effets sur la croissance de souches <i>C. acnes</i> RT4 et RT6	225
B.	Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la formation de biofilm par <i>S. epidermidis</i> MFP04 et <i>S. aureus</i> MFP03	226
C.	Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la formation de biofilm par <i>C. acnes</i> RT4 et RT6	229
D.	Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'activité cytotoxique de <i>S. epidermidis</i> MFP04 et <i>S. aureus</i> MFP03 sur les kératinocytes	232
E.	Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la réponse inflammatoire des kératinocytes induite par <i>C. acnes</i> RT4 et RT6	233
<b>III.</b>	<b>Conclusions</b>	<b>235</b>
<b>Chapitre 6 : Discussion générale</b>		<b>239</b>
<b>I.</b>	<b>Production de fractions polysaccharidiques et oligosaccharidiques enrichies en ulvanes à activité anti-inflammatoire</b>	<b>240</b>
A.	Production de fractions polysaccharidiques enrichies en ulvanes : fractions d'ulvanes	240
1.	L'extraction des ulvanes	241
2.	Macération vs EAE : l'EAE un procédé prometteur	243
3.	La purification des ulvanes : la dialyse, le procédé le plus efficace	244



B. Dépolymérisation des ulvanes pour la production de fractions oligosaccharidiques : fractions d'oligo-ulvanes	246
1. Fractions d'ulvanes de hauts poids moléculaires	246
2. Deux procédés de dépolymérisation efficaces	246
3. Des fractions d'oligo-ulvanes appauvries en sulfates	248
C. Recherche d'activités biologiques des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à des fins d'applications cosmétiques	249
1. Recherche d'activité antiradicalaire par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes	249
2. Activité anti-inflammatoire par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes	251
3. Recherche d'activité anti-vieillessement <i>via</i> l'inhibition de l'élastase par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes	252
<b>II. Modulation de l'activité cellulaire des fibroblastes en culture et de la synthèse des composants de la MEC dermique par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes</b>	<b>255</b>
A. Stimulation de la prolifération des fibroblastes par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes	255
B. Modulation de la synthèse des composants de la MEC par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes	258
1. Stimulation de la voie anabolique matricielle par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes	259
2. Stimulation de la voie catabolique matricielle par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes	262
3. Étude préliminaire des voies du TGF- $\beta$ et de NF- $\kappa$ B : quelle voie semble activée ou inhibée par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes ?	264
<b>III. Modulation de la virulence bactérienne par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes</b>	<b>267</b>
A. Influence sur <i>S. epidermidis</i> et <i>S. aureus</i> : deux staphylocoques commensaux	268
B. Influence sur <i>Cutibacterium acnes</i>	269
<b>IV. Relation structure/fonction des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes</b>	<b>273</b>
<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>279</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>287</b>
<b>Annexes</b>	<b>335</b>

# **Liste des abréviations & symboles**



## Liste des abréviations et symboles

$\alpha$ -SMA	« alpha Smooth Muscle Actin »
A	Ampère
Aap	« Accumulation-associated protein » ou Protéine associée à l'accumulation
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
AC	AntiCorps
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AG	Acide Gras
AGPI	Acide Gras PolyInsaturés
Agr	« Accessory gene regulator »
AH	Acide Hyaluronique
AhR	« Arylhydrocarbon Receptor »
Akt	Protéine kinase B
AMP	« AntiMicrobial Peptide » ou peptide antimicrobien
ANOVA	« ANalysis Of VAriance »
AP-1	« Activator Protein-1 »
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATCC	« American Type Culture Collection »
Bap	« Biofilm-associated protein » ou protéine associée au biofilm
BCA	Acide BiCinchoninique
bFGF	« basic Fibroblast Growth Factor»
BHI	« Brain Heart Infusion »
Bhp	Protéine homologue associée au biofilm
BMP	« Bone Morphogenic Protein »
BSA	« Bovine Serum Albumin » ou albumine de sérum bovin
CAMP	« Christie-Atkins-Munch-Peterson »
CAP	Protéine associée de manière covalente à la paroi
CAT	Catalase
CBF	« CCAAT Binding Factor »
CCL	« Chimiokine (C-C motif) Ligand »
CCN1	« Cysteine-rich angiogenic protein 61 »
CD	Cluster de Différenciation
Cdc-42	« Cell division control protein 42 »
CE <sub>50</sub>	Concentration Efficace médiane
CH <sub>3</sub> CN	Acétonitrile
CI <sub>50</sub>	Concentration Inhibitrice médiane
CIP	Collection Institut Pasteur
cm	centimètre
cm <sup>2</sup>	centimètre carré
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CTGF	« Connective Tissue Growth Factor »
DA	Dermatite Atopique
Da	Dalton
DEPC	DiÉthylPyroCarbonate
DMEM	« Dubelcco's Modified Eagle Medium »
DMSO	DiMéthylSulfOxyde

## Liste des abréviations et symboles

DNase	DésoxyriboNucléase
dNTP	désoxyriboNucléoside TriPhosphate
DO	Densité Optique
DP	Degré de Polymérisation
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
DsA	« Dermatan-sulfate Adhesin »
DTT	DiThioThréitol
EAE (E)	Extraction Assistée par Enzyme
EC	« Enzyme Commission » ou Commission des Enzymes
EDTA	ÉthylèneDiamineTétraAcétique
EDU	5-Éthyl-2-DÉoxyUridine
EGCG	ÉpiGalloCatéchine Gallate
EGF	« Endothelial Growth Factor »
ELISA	« Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay »
EPS	« Exopolymeric/Extracellular Polymeric Substances »
ERK	« Extracellular signal-Regulated Kinases »
Esp	Endopeptidase sérine protéase
ET-1	EndoThéline-1
FACIT	« Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple-helix »
FGF	« Fibroblast Growth Factor »
FLG	FiLaGgrine
FRAP	« Ferric Reducing-Antioxidant Power »
G	temps de Génération
g	gramme
g	gravité ou accélération centrifuge
G+	Gram positif
GAG	GlycosAminoGlycanes
Gal	Galactose
GAPDH	GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
Glc	Glucose
GlcA	Acide glucuronique
Gly	Glycine
GSH-Px	Glutathione Peroxydase
h	heure
H <sub>2</sub>	Dihydrogène
H <sub>2</sub> O	Eau
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	Ion oxonium
hBD	« human Beta Defensin » ou beta défensine humaine
hc-Krox	« human collagen-Kruppél box »
HCl	Acide chlorhydrique
HPAEC-PAD	Chromatographie Haute Performance Échangeuse d'Anions couplée à un Détecteur par Ampérométrie Pulsée
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HPSEC	Chromatographie d'exclusion stérique haute performance
HRP	« HorseRadish Peroxydase »
Hyp	Hydroxyproline
IFN-γ	Interféron-γ
IGF	« Insulin-like Growth Factor »
IKK	« IκB Kinase complex »

## Liste des abréviations et symboles

IL	InterLeukine
IMP	Protéine de la membrane interne
INCI	« International Nomenclature of Cosmetic Ingredients »
INT	IodoNitroTétrazolium
Ip	Indice de polydispersité
IRF-1	« Interferon Regulated Factor-1 »
IκB	« Inhibitor of NF-κB »
j	jour
J	Joule
JDE	Jonction Dermo-Épidermique
JNK	« c-Jun-N-terminal kinase »
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
kg	kilogramme
KRT	KéRaTine
L	Litre
LB	Lymphocyte B
LDH	Lactate DésHydrogénase
LoS	Sclérodémie Localisée
LOX	LipOXygénase
LPS	LipoPolySaccharide
LT	Lymphocyte T
LTA	« LipoTeichoic Acid » ou acide lipotéichoïque
M	Molaire
m <sup>2</sup>	mètre carré
MAA	« Mycosporine-like Amino Acid »
MALDI-TOF	« Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight »
MAPK	« Mitogen-Activated Protein Kinase »
MDA	MalonDiAldéhyde
MEC	Matrice ExtraCellulaire
mg	milligramme
MG	Matière Grasse
MHDP	Méta-HydroxyDiPhényle
MIC	Concentration Minimale Inhibitrice
min	minutes
miR-143	microARN-143
mJ	milliJoule
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	milliMolaire
MMLV	« Moloney Murine Leukemia Virus » ou virus de la leucémie murine Moloney
MMP	« Matrix MetalloProteinase » ou Métalloprotéinases matricielles
M <sub>n</sub>	Masse moléculaire moyenne en nombre
MOI	« Multiplicity Of Infection »
MS	Matière Sèche
MSCRAMM	« Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule »
MT-MMP	« Membrane-Type Matrix MetalloProteinase » ou MMP de type membrane
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
M <sub>w</sub>	Masse moléculaire moyenne en masse

## Liste des abréviations et symboles

N <sub>2</sub>	Diazote
NaCl	Chlorure de sodium
NAG	<i>N</i> -Acétyl-D-Glucosamine
NAM	Acide <i>N</i> -Acétyl-D-Muramique
NaNO <sub>3</sub>	Nitrate de sodium
NaOAc	Acétate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NF-1	« Nuclear Factor-1 »
NF-κB	« Nuclear Factor-kappa B »
ng	nanogramme
NIH	« National Institutes of Health »
nm	nanomètre
NMF	« Natural Moisturizing Factor »
NS ou ns	Non significatif
O/N	« OverNight »
ORAC	« Oxygen Radical Absorbance Capacity »
PA	PAstone
PAMP	« Pathogen Associated Molecular Pattern »
pb	paire de base
PBS	« Phosphate-Buffered Saline »
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
PDGF	« Platelet Derived Growth Factor »
PG	ProtéoGlycane
pg	picogramme
pH	potentiel Hydrogène
PI3K/apKC	« Phosphatidylinositol 3-Kinase/atypical protein kinase C »
PIA	« Polysaccharide Intercellular Adhesin » ou adhésine polysaccharidique intercellulaire
PM	Poids Moléculaire
PP	PolyPeptone
ppm	partie par million
Pro	Proline
PRR	« Pattern Recognition Receptor »
PSA	« Polysaccharide capSular Adhesin »
PSM	« Phenol Soluble Modulin »
PVDF	« PolyVinylidÈne Fluoride »
QS	« Quorum Sensing »
Rac-1	« Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 »
RCM	« Reinforced Clostridial Medium »
Rha	Rhamnose
RIPA	« Radio ImmunoPrecipitation Assay buffer »
RNS	« Reactive Nitrogen Species » ou espèces réactives de l'azote
ROS	« Reactive Oxygen Species » ou espèces réactives de l'oxygène
RPL13A	« Ribosomal Protein L13A »
rpm	rotation par minute
RPTP-κ	« Receptor type Protein-Tyrosinase Phosphatase κ »
RT	RiboType
RT-qPCR	« Reverse transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction »
SARA	« Smad Anchor for Receptor Activation »
ScS	Sclérodemie Systémique

## Liste des abréviations et symboles

SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	« Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis »
sec	seconde
SI	Système Immunitaire
siARN	« small interfering RNA » ou petits ARN interférents
SLM	« Sebum Like Medium »
SMAD	« S-Mother Against Ddp »
SOD	SuperOxyde Dismutase
Sp	« Specific protein »
SVF	Sérum de Veau Foetal
t	temps
TA	Température Ambiante
TBE	Tris-Borate-EDTA
TBST	« Tris-Buffered Saline + 0,1% Tween 20 »
TFA	Acide TriFluoroAcétique
TGF-β	« Transforming Growth Factor-beta »
TGM1	TransGlutaMinase 1
TGS	« Tris-Glycine-SDS »
TGX	« Tris-Glycine eXtended »
TIMP	« Tissue Inhibitor of MetalloProteinase »
TLR	« Toll-Like Receptor »
TMB	TétraMéthylBenzidine
TNF-α	« Tumor Necrosis Factor-alpha »
Tris	2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol
TSA	« Tryptic Soy Agar »
TSB	« Tryptic Soy Broth »
TβR	« Transforming growth factor beta Receptor »
U	Unité
UV	UltraViolet
µg	microgramme
µl	microlitre
µm	micromètre
v	volume
V	Volt
VCE	« Viral Core Enhancer »
VEGF	« Vascular Endothelial Growth Factor »
w	« weight »
WB	Western Blot
WST-1	2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H-tétrazolium
WTA	« Wall Teichoic Acid »
Xyl	Xylose
Zn <sup>2+</sup>	Ion zinc
%	Pourcentage
°C	degré Celsius
±	Plus ou moins
<	Inférieur
>	Supérieur





# **Table des illustrations**



## Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique des Eucaryotes.....	43
Figure 2 : Schéma du cycle de reproduction d' <i>Ulva</i> sp.....	45
Figure 3 : Photographie d' <i>Ulva</i> sp. collectée à Landrézac en mai 2018 .....	46
Figure 4 : Photographie d'une marée verte à ulves dérivantes sur la plage de Sainte Anne la Palud, Finistère (crédit photo : CEVA).....	47
Figure 5 : (A) Dénombrement des sites touchés par des échouages d'ulves en Bretagne de 2002 à 2018 en fonction de la saison et (B) Sites les plus fréquemment touchés par des échouages d'ulves en Bretagne de 1997 à 2018.....	48
Figure 6 : Classification des polysaccharides algaux .....	50
Figure 7 : Structure chimique de la laminarine .....	51
Figure 8 : Structure de base de l'amidon floridéen .....	51
Figure 9 : Structure moléculaire de l'alginate.....	54
Figure 10 : Structures moléculaires de polysaccharides riches en fucose.....	55
Figure 11 : Structure moléculaire de l'agar .....	56
Figure 12 : Structures moléculaires des carraghénanes .....	56
Figure 13 : Schéma de l'organisation structurelle de la paroi de l'algue verte <i>Ulva</i> sp. ....	57
Figure 14 : Sous-unités disaccharidiques majeures des ulvanes.....	58
Figure 15 : Schéma hypothétique des voies de biosynthèse des ulvanes .....	59
Figure 16 : Nombre de publications scientifiques sur les ulvanes de 2000 à 2020.....	60
Figure 17 : Aperçu de l'évolution des publications sur l'extraction assistée par enzyme appliquée aux algues.....	61
Figure 18 : Mécanismes de dépolymérisation des ulvanes par voie chimique d'hydrolyse acide : exemple de l'acide ulvanobiuronique-3-sulfate type A (A <sub>3S</sub> ).....	64
Figure 19 : Mécanismes de dépolymérisation des ulvanes par voie chimique d'hydrolyse radicalaire : exemple de l'acide ulvanobiuronique-3-sulfate type A (A <sub>3S</sub> ).....	65
Figure 20 : Schéma de la structure de la peau et de ses annexes.....	80
Figure 21 : Organisation de l'épiderme cutané humain .....	81
Figure 22 : Microscopie optique de kératinocytes HaCaT à 80% de confluence (x10).....	81
Figure 23 : Représentation schématique d'un desmosome et d'un hémidesmosome.....	82
Figure 24 : Schéma (A) du derme papillaire et (B) du derme réticulaire .....	84
Figure 25 : Microscopie optique de fibroblastes dermiques cutanés humains à 80% de confluence (x10).....	85
Figure 26 : Principaux composants de la MEC du derme cutané.....	86
Figure 27 : Schéma de l'organisation des molécules d'élastine incorporées dans la fibre après pontage des molécules de tropoélastine dans la fibre (A) relâchée et (B) étirée .....	86
Figure 28 : Structures disaccharidiques des GAG de la MEC cutanée.....	87

Figure 29 : Schéma de la composition des GAG et PG avec (A) les holosides de base, (B) le GAG non sulfaté principal (AH) et les GAG sulfatés (chondroïtine sulfate, dermatane sulfate, héparane sulfate) et (C) les protéoglycanes .....	88
Figure 30 : Schéma d'une fibrille de collagène illustrant la structure triple hélicoïdale des chaînes $\alpha$ avec le triplet répété d'acides aminés [Gly-X-Y] .....	89
Figure 31 : Membres de la superfamille des collagènes et leurs assemblages supramoléculaires connus .....	90
Figure 32 : Photographies au microscope électronique à balayage de fibrilles de collagènes .....	91
Figure 33 : Structure du tropocollagène de type I .....	91
Figure 34 : Schéma des gènes <i>COL1A1</i> et <i>COL1A2</i> codant pour les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I .....	92
Figure 35 : Schéma de la biosynthèse d'une fibre de collagène de type I .....	93
Figure 36 : Représentation schématique du promoteur proximal du gène <i>COL1A1</i> et des facteurs <i>trans</i> activateurs et répresseurs .....	94
Figure 37 : Schéma de la voie canonique « classique » de NF- $\kappa$ B .....	95
Figure 38 : Schéma de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ et implication des SMAD .....	96
Figure 39 : Structure d'une MMP .....	99
Figure 40 : Localisation des TIMP et interactions avec les MMP majoritaires du derme .....	100
Figure 41 : Étapes de la cicatrisation cutanée .....	101
Figure 42 : Schéma de la pathogénèse complexe de la sclérodémie systémique .....	105
Figure 43 : Remodelage de la MEC dermique lié au vieillissement intrinsèque et extrinsèque (peau photoexposée) .....	106
Figure 44 : Schéma de la pénétration des UV dans la peau, source de photovieillissement .....	107
Figure 45 : Représentation schématique de la pathogénèse du vieillissement cutané intrinsèque et extrinsèque .....	108
Figure 46 : Distribution topographique des genres bactériens <i>Staphylococcus</i> et <i>Cutibacterium</i> en fonction du pH et de la température des régions sèches, humides et sébacées .....	112
Figure 47 : Structure de la paroi des bactéries à Gram positif .....	113
Figure 48 : <i>Staphylococcus epidermidis</i> observé par microscopie électronique à balayage .....	113
Figure 49 : <i>Staphylococcus aureus</i> observé par microscopie électronique à raster .....	114
Figure 50 : <i>Cutibacterium acnes</i> souche KPA observé par microscopie électronique à balayage .....	114
Figure 51 : Schéma de la réponse immunitaire cutanée innée primaire .....	118
Figure 52 : Schéma des interactions peau – bactéries dans le cadre d'une peau saine et dans le cadre d'une dysbiose (exemple de l'acné) : focus sur <i>S. epidermidis</i> et <i>C. acnes</i> .....	119
Figure 53 : Représentation générale des étapes de la formation d'un biofilm .....	120
Figure 54 : Distribution de l'abondance relative de souches de <i>C. acnes</i> au sein de l'unité pilosébacée du nez entre des patients acnéiques et sains .....	121
Figure 55 : Modèle proposé des principaux processus induits par <i>C. acnes</i> au niveau des kératinocytes, sébocytes et monocytes dans l'acné vulgaire .....	123

Figure 56 : Pathogénèse de la dermatite atopique et implication de <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i> .....	125
Figure 57 : Prétraitement des algues .....	135
Figure 58 : Montage en série de réacteurs (Mac Technologie) pour l'extraction par macération ou par EAE.....	136
Figure 59 : Étapes de la précipitation polysaccharidique .....	136
Figure 60 : Série de procédés d'extraction et de purification des ulvanes à partir de la macroalgue <i>Ulva</i> sp.....	137
Figure 61 : Étapes de la dialyse des solutions polysaccharidiques.....	138
Figure 62 : Série de procédés détaillés de dépolymérisation utilisant la résine Amberlite (AD) ou le peroxyde d'hydrogène (HD) .....	139
Figure 63 : Réaction du dosage des groupements sulfates, liés aux polysaccharides, par la méthode de Jaques <i>et al.</i> (1968).....	141
Figure 64 : Réaction du dosage des sucres totaux par la méthode de Dubois <i>et al.</i> (1956).....	141
Figure 65 : Réaction du dosage des acides uroniques par la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) modifiée par Filisetti-Cozzi et Carpita (1991) .....	142
Figure 66 : Réaction du dosage des protéines par la méthode de Smith <i>et al.</i> (1985) .....	143
Figure 67 : Programme d'élution appliqué au niveau du système HPAEC-PAD pour l'analyse en monosaccharides .....	145
Figure 68 : Réaction de piégeage du radical DPPH* en présence d'antioxydant.....	147
Figure 69 : Hydrolyse de la N-methoxysuccinyl-ala-ala-pro-val-p-nitroanilide par l'élastase .....	148
Figure 70 : Réaction d'oxydation de l'acide linoléique par la 15-lipoxygénase .....	149
Figure 71 : Clivage du sel de tétrazolium WST-1 en formazan par les déshydrogénases mitochondriales .....	151
Figure 72 : Libération de LDH par les cellules lysées mesurée par supplémentation de lactate, NAD <sup>+</sup> et de l'INT comme substrats en présence de diaphorase.....	151
Figure 73 : Rendements de production des ulvanes bruts issus de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E).....	168
Figure 74 : Taux de recouvrement des polysaccharides obtenus par les différents procédés de purification employés à partir des ulvanes bruts issus de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E) .....	169
Figure 75 : Composition biochimique (% MS extrait) des ulvanes bruts et purifiés issus de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E).....	170
Figure 76 : Composition en monosaccharides (% de sucres totaux) des ulvanes bruts et purifiés, issus de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E) .....	172
Figure 77 : Chromatogramme HPSEC modifié du suivi de dépolymérisation des ulvanes par hydrolyse radicalaire .....	174
Figure 78 : Chromatogramme HPSEC des ulvanes dépolymérisés par hydrolyses radicalaire et acide .....	176

Figure 79 : Rendements de production des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide ( $n=3$ ) et radicalaire ( $n=1$ ), issus de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E).....	176
Figure 80 : Composition biochimique (% MS extrait) des ulvanes dépolymérisés issus de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E).....	177
Figure 81 : Composition en monosaccharides (% de sucres totaux) des ulvanes dépolymérisés issus de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E).....	178
Figure 82 : Spectre de masse MALDI-TOF du standard de dextran 1 kDa.....	179
Figure 83 : Exemple de spectre de masse MALDI-TOF d'ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide issues d' <i>Ulva</i> sp. par EAE.....	180
Figure 84 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération ou EAE sur l'inhibition de la lipoxycgénase.....	181
Figure 85 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E) sur la prolifération de fibroblastes dermiques humains en culture, aux concentrations de 50, 100, 250, 500 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ après (A) 24 h et (B) 48 h d'incubation, évalués par le test WST-1.....	190
Figure 86 : Évaluation de la cytotoxicité potentielle des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E) sur des fibroblastes dermiques humains en culture après (A) 24 h et (B) 48 h d'incubation, aux concentrations de 50, 100, 250, 500 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ , évalués par le dosage de la LDH.....	193
Figure 87 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E) sur la synthèse de collagène total par les fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation, aux concentrations de 50 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ , évalués par le test au rouge Sirius.....	195
Figure 88 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E), aux concentrations de 50 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ , sur le niveau d'expression des ARNm de (A) <i>COL1A1</i> et (B) <i>COL1A2</i> de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation.....	197
Figure 89 : Néosynthèse du procollagène de type I alpha 1 par les fibroblastes dermiques humains en culture, après 48 h d'incubation, en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E), aux concentrations de 50 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ , évaluée par un dosage ELISA.....	198
Figure 90 : Néosynthèse du collagène de type I mature par les fibroblastes dermiques humains en culture, après 48 h d'incubation, en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E), à la concentration de 1000 $\mu\text{g/ml}$ , évaluée par Western Blot.....	199
Figure 91 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E), aux concentrations de 50 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ , sur le niveau d'expression des ARNm de <i>COL3A1</i> de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation.....	200

Figure 92 : Néosynthèse du collagène de type III mature par les fibroblastes dermiques humains en culture, après 48 h d'incubation, en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), à la concentration de 1000 µg/ml, évaluée par Western Blot .....201

Figure 93 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), aux concentrations de (A) 50 et (B) 1000 µg/ml, sur la synthèse de GAG sulfatés et non sulfatés par les fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation, évalués par le test au bleu alcian.....202

Figure 94 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml, sur le niveau d'expression des ARNm de *MMP-1* de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation .....205

Figure 95 : Néosynthèse de la *MMP-1* par les fibroblastes dermiques humains en culture, après 48 h d'incubation, en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml, évaluée par un dosage ELISA .....206

Figure 96 : Néosynthèse de la *MMP-1* par les fibroblastes dermiques humains en culture, après 48 h d'incubation, en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E) à la concentration de 1000 µg/ml, évaluée par Western Blot .....207

Figure 97 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), à la concentration de 1000 µg/ml, sur l'activité enzymatique de la *MMP-1* de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation, évalués par zymographie .....208

Figure 98 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml, sur le niveau d'expression des ARNm de *TIMP-1* de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation .....209

Figure 99 : Néosynthèse du *TIMP-1* par les fibroblastes dermiques humains en culture, après 48 h d'incubation, en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), à la concentration de 1000 µg/ml, évaluée par Western Blot .....210

Figure 100 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), à la concentration de 1000 µg/ml, sur le niveau d'expression des ARNm de *TGF-β1* de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation .....212

Figure 101 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), à la concentration de 1000 µg/ml, sur le niveau d'expression des ARNm de *SMAD2*, *SMAD3* et *SMAD4* de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation.....213

Figure 102 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), à la concentration de 1000 µg/ml, sur le niveau d'expression des ARNm de *p65* de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation .....214

Figure 103 : Cinétiques de croissance de *S. epidermidis* MFP04 en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml .....223



Figure 104 : Cinétiques de croissance de <i>S. aureus</i> MFP03 en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml .....	224
Figure 105 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml sur le temps de génération de <i>S. epidermidis</i> MFP04 et <i>S. aureus</i> MFP03 .....	224
Figure 106 : Cinétiques de croissance de <i>C. acnes</i> RT4 en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml .....	225
Figure 107 : Cinétiques de croissance de <i>C. acnes</i> RT6 en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml .....	225
Figure 108 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml sur le temps de génération de <i>C. acnes</i> RT4 et RT6.....	226
Figure 109 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml sur la capacité de formation de biofilm de <i>S. epidermidis</i> MFP04, évalués par microscopie confocale à balayage laser .....	227
Figure 110 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml sur la capacité de formation de biofilm de <i>S. aureus</i> MFP03, évalués par microscopie confocale à balayage laser .....	228
Figure 111 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml sur la capacité de formation de biofilm de <i>C. acnes</i> RT4, évalués par microscopie confocale à balayage laser .....	230
Figure 112 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml sur la capacité de formation de biofilm de <i>C. acnes</i> RT6, évalués par microscopie confocale à balayage laser .....	231
Figure 113 : Activités cytotoxiques de (A) <i>S. epidermidis</i> MFP04 et (B) <i>S. aureus</i> MFP03 sur les kératinocytes HaCaT après exposition aux fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml (16 h, MOI 10), évaluées par dosage de la LDH .....	232
Figure 114 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml sur le potentiel inflammatoire de <i>C. acnes</i> (A) RT4 et (B) RT6, mesurés par dosage d'IL-8 libérée par les kératinocytes HaCaT (18 h, MOI 50) .....	233
Figure 115 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par EAE, aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml, sur le niveau d'expression des ARNm de <i>COL1A1</i> de fibroblastes dermiques humains en culture après 24 h d'incubation .....	260
Figure 116 : Schéma simplifié de l'action des voies de signalisation du TGF-β1 et de NF-κB au niveau du promoteur proximal de <i>COL1A1</i> .....	264

## Liste des tableaux

Tableau I : Récapitulatif de la systématique d' <i>Ulva</i> sp. ....	45
Tableau II : Polysaccharides pariétaux d'algues.....	52
Tableau III : Polysaccharides majoritaires de la phase matricielle des macroalgues .....	53
Tableau IV : Extraction des ulvanes par EAE .....	62
Tableau V : Composés bioactifs algaux et leurs fonctions en cosmétique.....	69
Tableau VI : Activités biologiques potentielles cosmétiques de polysaccharides algaux.....	74
Tableau VII : Classification de métalloprotéinases majoritaires du derme .....	98
Tableau VIII : Modifications majeures des composants de l'épiderme et du derme avec le vieillissement intrinsèque et extrinsèque .....	106
Tableau IX : Paramètres de l'immunoblotting .....	156
Tableau X : Amorces utilisées en RT-PCR en temps réel (Bio-Rad) .....	159
Tableau XI : Composition des milieux TSB et RCM (PP ou PA) .....	160
Tableau XII : Conditions de dépolymérisation des ulvanes et colonnes chromatographiques .....	173
Tableau XIII : Caractérisation par HPSEC des poids moléculaires moyens des ulvanes purifiés par précipitation éthanolique et dépolymérisés par hydrolyse radicalaire ou acide .....	175
Tableau XIV : Rappel des taux de recouvrements de polysaccharides, des compositions biochimiques et monosaccharidiques, des poids moléculaires des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E), et résultats d'activité anti-inflammatoire .....	184
Tableau XV : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E) sur la synthèse de composants de la MEC .....	204
Tableau XVI : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E) sur le catabolisme matriciel de fibroblastes et son inhibition .....	211
Tableau XVII : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E) à la concentration de 1000 µg/ml sur la voie anabolique du TGF-β1 et catabolique de NF-κB des fibroblastes .....	215
Tableau XVIII : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par macération (M) ou EAE (E) à la concentration de 1000 µg/ml sur l'anabolisme et le catabolisme matriciel de fibroblastes .....	218
Tableau XIX : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue <i>Ulva</i> sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml sur les bactéries cutanées <i>S. epidermidis</i> MFP04, <i>S. aureus</i> MFP03, <i>C. acnes</i> RT4 et RT6.....	236



# **Avant-propos**



# Avant-propos

La cosmétique évolue depuis quelques années avec un principe de naturalité qui s'impose de plus en plus comme un axe d'innovation majeur. L'enjeu de ce secteur est donc de répondre aux attentes des consommateurs concernant un principe d'écoresponsabilité. Pour cela, le produit cosmétique doit être porteur des messages de la société moderne c'est-à-dire être équitable, durable, soutenable et responsable, tout en étant efficace d'un point de vue biologique et conforme à la législation en vigueur. Ainsi, les ressources naturelles renouvelables et les biotechnologies ont un rôle important à jouer dans le secteur de l'industrie cosmétique. La recherche dans ce domaine s'oriente alors vers la découverte d'ingrédients actifs biosourcés, répondant aux attentes des consommateurs, qui agissent sur la peau tout en maintenant l'homéostasie cutanée. Par ailleurs, une nouvelle démarche d'innovation en cosmétique est désormais la prise en compte du microbiote de la peau, qui a également un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cutanée.

Dans ce contexte, le milieu marin et plus spécifiquement les macroalgues sont une ressource importante en offrant une diversité biologique et biochimique (Brunt & Burgess, 2018). L'un des plus grands champs d'algues naturel en Europe correspond à la Bretagne, avec près de 800 îles et îlots et 2700 km de côtes littorales. Riche d'une diversité, le littoral breton recense près de 700 espèces d'algues comprenant les algues vertes (*Chlorophyceae*), les algues rouges (*Rhodophyceae*) et les algues brunes (*Phaeophyceae*). Les activités autour de cette ressource se sont diversifiées depuis les années 1980 avec des applications en agro-alimentaire, cosmétique mais également thalassothérapie et pharmaceutique. Parmi cette diversité d'algues, on retrouve l'algue verte *Ulva* sp. comme espèce proliférative, à l'origine des marées vertes notamment en Bretagne Nord et Ouest, mais également en Bretagne Sud, entre mars et juin. Les échouages massifs d'algues vertes obligent les communes à effectuer un ramassage en urgence sous la pression des riverains notamment à cause de l'exposition possible à de l'hydrogène sulfuré issu de la décomposition de l'algue. Malheureusement, ces algues ne sont à l'heure actuelle que faiblement valorisées dans l'épandage agricole ou le compostage, n'apportant ainsi que peu de valeur ajoutée à cette biomasse. Les travaux de thèse réalisés sur *Ulva armoricana* dans le cadre du projet ULVANS en partenariat avec le LBCM, achevé en 2015, ont permis de confirmer la disponibilité de la biomasse et d'évaluer sa qualité (Hardouin, 2015). De nombreuses études réalisées sur des extraits et/ou molécules issues d'*Ulva* sp. ont démontré des activités biologiques notamment antioxydante (Qi *et al.*, 2005a ; Peasura *et al.*, 2015 ; Hardouin *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2018 ; Le *et al.*, 2019), antivirale (Morán-Santibañez *et al.*, 2016 ; Hardouin *et al.*, 2016), immunomodulatoire (Tabarsa *et al.*, 2012 ; Peasura *et al.*, 2016 ; Kidgell *et al.*, 2020) ou anticoagulante (Mao *et al.*, 2006 ; Thi *et al.*, 2016 ; Adrien *et al.*, 2017a, 2019 ; Lekshmi & Muraleedhara Kurup, 2019 ; Guidara *et al.*, 2021). Toutefois, dans le cadre du système cutané, les études restent peu nombreuses et sont relativement récentes sur l'activité de molécules issues d'*Ulva* sp. (Ko *et al.*, 2013 ; Potter *et al.*, 2015 ; Cai *et al.*, 2016 ; Adrien *et al.*, 2017b ; Bodin *et al.*, 2020). Cette algue verte apparaît donc comme une ressource naturelle d'intérêt, valorisable en cosmétique.

Les échouages massifs ont été l'un des premiers critères pour la sélection d'*Ulva* sp. comme modèle d'étude de ces trois années de recherche. Une autre raison de sa sélection est sa forte teneur en métabolites notamment en polysaccharides sulfatés potentiellement valorisables dans le domaine à haute valeur ajoutée de la cosmétique.

L'objectif de ce projet de thèse consiste en l'extraction, la purification et la caractérisation des fractions de l'algue proliférative *Ulva* sp. ainsi que la mise en évidence des effets potentiels sur le système cutané. Dans le cadre d'une application biotechnologique, ce travail peut permettre d'identifier de nouveaux ingrédients biosourcés pour des applications cosmétiques, notamment dans le cadre de stratégies de réparation cutanée ou anti-vieillessement ou de maintien du microbiote cutané sain. Les originalités de ce projet résident dans l'utilisation d'une technologie d'extraction innovante écoresponsable, l'Extraction Assistée par Enzyme (EAE), pour la production de fractions, mais également sur l'orientation du travail sur le système cutané, en s'intéressant aux effets des fractions sur les fibroblastes du derme humain et sur le microbiote cutané. À l'heure actuelle, peu d'études se sont portées sur les effets de molécules d'*Ulva* sp. sur le système cutané et aucune étude relatant une activité sur le microbiote cutané n'a été démontrée.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du **L**aboratoire de **B**iotecnologies et **C**himies **M**arines (LBCM) sur les sites de Vannes, centré sur les recherches en biotechnologies bleues, les biofilms et microbiomes marins et de l'**U**niversité **C**atholique de l'**O**uest (UCO) de Guingamp, centrée sur les recherches d'évaluation d'activités biologiques de molécules d'origine marine appliquées au système cutané. Les travaux ont été réalisés sous la direction du Professeure Nathalie Bourgougnon et l'encadrement des Maîtres de conférences Gilles Bedoux et Thomas Latire. Cette thèse permet de poursuivre la collaboration initiée entre les deux sites concernant la valorisation de molécules d'origine algale pour des applications cosmétiques, et d'augmenter les connaissances sur les caractérisations biochimiques de l'espèce *Ulva* sp..

Les travaux de thèse sont articulés autour de différents axes majeurs présentés en six chapitres.

Le **chapitre 1** correspond à la revue de littérature. Il se constitue de trois parties. La première partie présente les connaissances actuelles concernant les macroalgues dont l'algue verte proliférative *Ulva* sp., et, plus particulièrement, leur composition biochimique en polysaccharides. Les méthodes d'extraction innovantes et de dépolymérisation des polysaccharides ainsi que leurs effets biologiques notamment en cosmétique et sur le système cutané sont également décrits. La seconde partie s'intéresse à présenter les connaissances sur les fibroblastes de la peau et la régulation de la matrice extracellulaire. Enfin, la troisième partie traite du rôle du microbiote cutané dans l'homéostasie cutanée et notamment du rôle de trois bactéries cutanées : *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Cutibacterium acnes*.

Les objectifs de ce travail de thèse sont présentés à la suite de ce chapitre introductif.

Le **chapitre 2** constitue la description des matériels et méthodes employés lors des différentes expérimentations.

Le **chapitre 3** est consacré à la production de fractions riches en ulvanes issues d'*Ulva* sp. par comparaison de deux procédés : la macération et l'EAE, la purification des fractions, leur dépolymérisation et leur caractérisation. L'évaluation des activités biologiques des fractions par des tests biochimiques a été réalisée *in vitro*.

Le **chapitre 4** s'intéresse aux activités biologiques des fractions poly- et oligosaccharidiques issues d'*Ulva* sp., *in vitro*, sur le métabolisme des fibroblastes dermiques humains en culture primaire et sur la régulation de la matrice extracellulaire synthétisée par ces fibroblastes. Pour cela, une attention particulière a été faite sur les molécules majeures du derme matriciel (collagènes de type I et III, et glycosaminoglycanes) ainsi que sur la régulation de la synthèse de collagène *via* l'étude de la MMP-1 et du TIMP-1, mais également *via* l'étude préliminaire des voies de signalisation du TGF- $\beta$  et de NF- $\kappa$ B.

Le **chapitre 5** concerne l'évaluation des effets des fractions poly- et oligosaccharidiques issues d'*Ulva* sp. par EAE sur le microbiote cutané et, plus particulièrement, sur trois bactéries cutanées : *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Cutibacterium acnes*. Pour cela, les effets des fractions sur la croissance bactérienne et la formation du biofilm ont été étudiés. Les effets des fractions sur la virulence bactérienne de ces souches (cytotoxicité ou potentiel inflammatoire) sur les kératinocytes ont également été évalués. Ce travail a fait l'objet d'une mobilité de 3 mois au sein du **Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM, EA4312)** d'Évreux, sous la direction du Professeur Marc Feuilloley.

Le **chapitre 6** présente la discussion générale concernant la production, par la technique de l'EAE puis par purification et dépolymérisation, de fractions poly- et oligosaccharidiques issues d'*Ulva* sp. ainsi que les effets biologiques de ces fractions sur les fibroblastes dermiques humains et le microbiote cutané pour une valorisation potentielle dans le domaine dermo-cosmétique.

Une conclusion générale ainsi que des perspectives d'études sont discutées à la fin de ce manuscrit.





# **Chapitre 1**

## **Revue de la littérature**



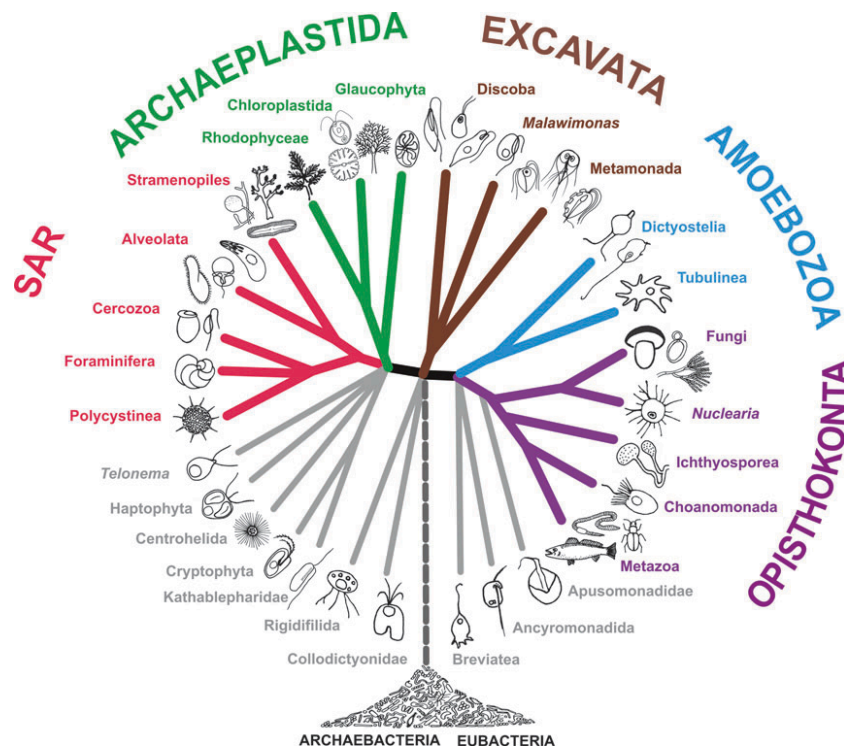
# Chapitre 1 : Revue de la littérature

## I. Les macroalgues : sources de polysaccharides bioactifs - focus sur *Ulva* sp. et les ulvanes

### A. Généralités sur les macroalgues et l'algue d'étude *Ulva* sp.

#### 1. Définitions et écologie des macroalgues

Le terme « algue » regroupe à la fois les **macroalgues**, macroscopiques et pluricellulaires, et les **microalgues**, microscopiques et unicellulaires. Les macroalgues forment ainsi un groupe extrêmement diversifié d'organismes aquatiques, eucaryotes, photosynthétiques possédant de la chlorophylle *a*. Elles peuvent être fixées sur un substrat (algues benthiques) ou vivre en suspension dans l'eau (algues pélagiques) (Adl *et al.*, 2012 ; Brown *et al.*, 2013 ; Speijer *et al.*, 2015 ; Burki *et al.*, 2016).



**Figure 1 : Arbre phylogénétique des Eucaryotes**  
D'après Adl *et al.* (2012).

Les macroalgues rouges (*Rhodophyta*) et vertes (*Viridiplantae* ou *Chloroplastida*) sont présentes au sein des *Archaeplastida*, les macroalgues brunes (*Phaeophyta*) au sein des Straménopiles sans lien de parenté avec les plantes (Figure 1). En effet, les Archaeplastidiées, c'est-à-dire les algues rouges, vertes et les plantes terrestres, ont en commun un événement qui leur a permis de réaliser la photosynthèse oxygénique par le phénomène de l'**endosymbiose primaire** au cours duquel une Cyanobactérie proche des *Gloeomargarita* a été endocytée par une cellule eucaryote non photosynthétique.

À l'issue de cette endosymbiose primaire ont donc émergé les algues rouges, les Glaucophytes et les algues vertes. Les algues brunes ont une histoire évolutive très différente, car elles ont acquis la capacité à réaliser la photosynthèse par un événement d'endosymbiose secondaire. Les lignées issues d'endosymbioses secondaires, voire tertiaires entre un eucaryote primitif non photosynthétique et une algue unicellulaire rouge comprennent les lignées Alvéolés, Ochrophytes au sein des Straménopiles, Cryptophytes et Haptophytes. Les macroalgues brunes appartiennent au phylum des Straménopiles. L'émergence du groupe des Eucaryotes Straménopiles est datée de plus d'un milliard d'années. Les macroalgues brunes se présentent comme la seule lignée du groupe ayant acquis la multicellularité complexe. Elles ont évolué indépendamment des Archaeplastida. Il paraît donc difficile de considérer les macroalgues comme un taxon, elles sont fortement polyphylétiques (Baldauf, 2008 ; Tirichine & Bowler, 2011 ; Adl *et al.*, 2012 ; Burki *et al.*, 2016 ; Bourgougnon *et al.*, 2021).

Les macroalgues, rencontrées dans l'océan ou sur l'estran, représentent un groupe hautement diversifié, estimé à 46929 espèces dont environ 7327 espèces de macroalgues rouges (phylum *Rhodophyta* ou *Rhodoplantae*), 2070 espèces de macroalgues brunes (phylum *Ochrophyta* - Chromobiontes, classe *Phaeophyceae*), et 6733 espèces de macroalgues vertes phylum *Chlorophyta*) (Guiry, M.D. & Guiry, 2020). Les noms d'algues rouges, brunes et vertes dérivent des pigments caractéristiques prédominants phycoérythrine, fucoxanthine et chlorophylle, respectivement (Pereira, 2021). Elles se différencient par des aspects macro- et microscopiques, structuraux et biochimiques comme la nature des constituants de la paroi et des composés de stockage.

Les macroalgues marines vivent pour la plupart attachées à un substrat dans des zones côtières, au niveau de la zone intertidale, et sont soumises à un environnement variable dû au cycle des marées, et à différents paramètres biotiques (agents pathogènes, herbivores, épiphytes et endophytes) et abiotiques (hydrodynamisme, dessiccation, lumière, température, salinité, composition chimique de l'eau de mer). Aussi, afin de faire face à cet environnement très variable, les algues ont la capacité de répondre à ces changements en adaptant leur photosynthèse, leur respiration ou leur reproduction. Pour cela, elles synthétisent de nombreux composés, spécifiques à chaque espèce, dont des pigments (photosynthétiques ou photoprotecteurs), des acides aminés de type mycosporine, des lipides, des protéines, des polysaccharides ou des composés phénoliques (Lalegerie *et al.*, 2020).

## 2. Histoire, distribution et reproduction de l'algue verte *Ulva* sp.

Au sein du phylum *Chlorophyta*, les macroalgues vertes sont classiquement réparties entre quatre classes : les Trebouxiophyceae, Chloropicophyceae, Ulvophyceae, et Prasinophyceae mais d'autres classes sont identifiées comme les Chlorodendrophyceae, Chlorophyceae, Mamiellophyceae, Nephroselmidophyceae, Pedinophyceae, Picosystophyceae et Pyramimonadophyceae (Leliaert *et al.*, 2012 ; Guiry, M.D. & Guiry, 2020).

La classe des **Ulvophyceae** incluent notamment l'ordre des **Ulvales** avec 257 espèces dénombrées dont la famille des **Ulvaceae** incluant le genre **Ulva** avec 86 espèces identifiées (Guiry, M.D. & Guiry, 2020). La systématique d'*Ulva* sp. est récapitulée dans le Tableau I ci-contre. Les algues *Ulva* sp. (Linnaeus), couramment appelées « ulves » ou « laitue de mer », se développent sur des zones rocheuses inter- et subtidales peu profondes.

Tableau I : Récapitulatif de la systématique d'*Ulva* sp.

	<i>Ulva</i> sp.
Empire	Eukaryote
Royaume	Plante
Sous-royaume	Viridiplantae
Phylum	<i>Chlorophyta</i>
Sous-phylum	Chlorophytina
Classe	Ulvophyceae
Ordre	Ulvales
Famille	<i>Ulvaceae</i>
Genre	<i>Ulva</i>
Espèce	<i>Ulva</i> sp.

La reproduction est une étape importante du cycle de vie de l'algue en contribuant à la survie et la pérennisation de l'espèce. La majorité des algues ont des cycles de vie diphasiques c'est-à-dire comportant deux générations impliquant un gamétophyte haploïde vivant libre et un sporophyte diploïde (Balar & Mantri, 2020). Les espèces du genre *Ulva* sont représentées par un cycle biologique isomorphe de reproduction digénétique haplodiplophasique (Figure 2). Les gamétophytes et sporophytes sont morphologiquement similaires, et ne diffèrent que par leur ploïdie et leurs fonctions (Balar & Mantri, 2020).

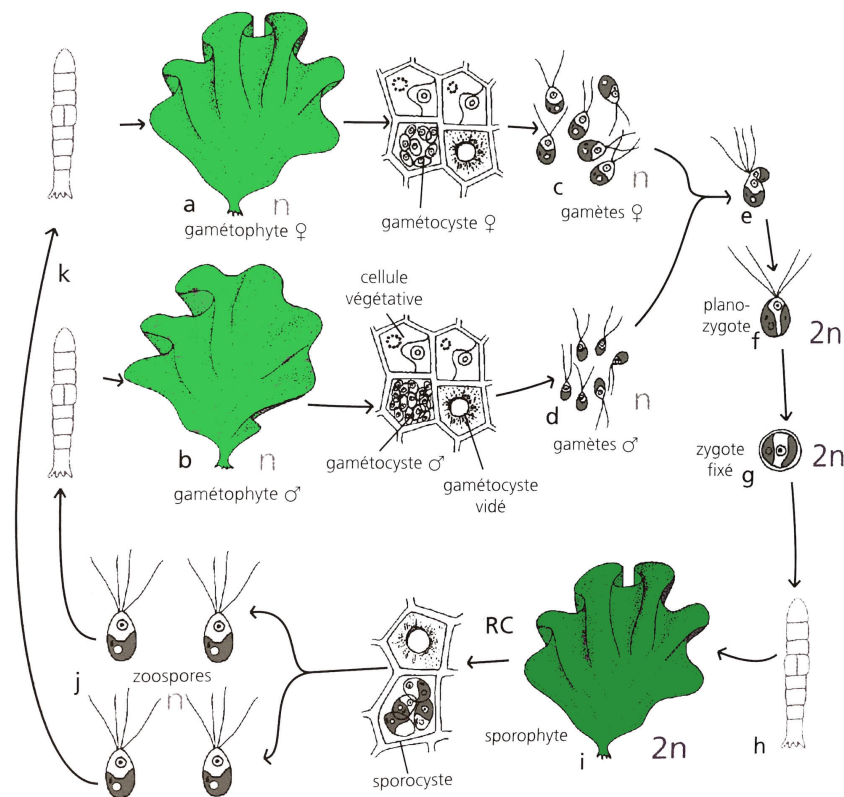


Figure 2 : Schéma du cycle de reproduction d'*Ulva* sp.

a. Gamétophyte femelle haploïde avec gamétocystes. b. Gamétophyte mâle avec gamétocystes. c. Gamètes femelles biflagellés. d. Gamètes mâles biflagellés. e. Fécondation. f. Planozygote diploïde. g. Fixation du zygote avec perte des flagelles. h. Germination du zygote. i. Sporophyte diploïde avec sporocystes. j. Spores haploïdes quadriflagellées. k. Germination des spores. RC : réduction chromatique. Modifié d'après de Reviere (2002).

Ce cycle se compose de deux phases, une haploïde du gamétophyte ( $n$  chromosomes) et une diploïde du sporophyte ( $2n$  chromosomes). Ainsi, le sporophyte se reproduit de manière asexuée à l'aide de zoospores tandis que le gamétophyte se reproduit sexuellement par fusion des gamètes. Plus précisément, la fusion des gamètes mâles et femelles isomorphes biflagellés aboutit à la formation du planozygote ( $2n$ ) à quatre flagelles. Il se fixe ensuite au substrat et devient ainsi la fin de la génération. Le sporophyte adulte diploïde libère, après méiose, des zoospores haploïdes dans l'environnement, aboutissant après croissance végétative à des gamétophytes mâles ou femelles (Balar & Mantri, 2020).

Le développement végétatif des ulves peut se produire par croissance lorsque l'algue est attachée à son substrat mais également se prolonger en flottaison dans l'eau après décrochage ou fragmentation (De Casabianca *et al.*, 2002).

Les ulves ont une durée de vie limitée de quelques semaines, et plusieurs générations se succèdent au cours de l'année. La période de reproduction d'*Ulva* est généralement au printemps et à la fin de l'année.

### 3. Morphologie de l'algue *Ulva* sp.

L'appareil végétatif mature d'*Ulva* sp., aplati, se constitue de deux couches de cellules contenant chacune un unique chloroplaste dont la forme et la taille diffèrent selon les espèces. En général, l'appareil végétatif atteint 30 à 50 cm (Fleurence & Levine, 2016). Le système de fixation au substrat se constitue d'un petit disque formé de cellules rhizoïdales (Sharma, 2011).

La forme de l'appareil végétatif est une lame caractéristique de l'espèce *Ulva lactuca* Linnaeus.

Les sous-espèces se distinguent par la forme de leurs thalles : de grandes feuilles plates parfois lobées ou aux bords ondulés pour *U. armoricana* aussi appelée *U. rigida*, cunéiformes pour *U. rotundata*, perforées pour *U. reticulata*, en petits filaments tubulaires pour *U. ramulosa*, et tubes avec ou sans ramifications pour *U. compressa*, *U. intestinalis* et *U. linza*. Les lames d'*Ulva armoricana* sont de forme variable, fragiles, facilement déchirables de 30 à 55  $\mu\text{m}$  dans les régions médianes et apicales. Elle se caractérise par une couleur vert pâle et une texture froissée créant une surface réfléchissante irrégulière (Figure 3) (Dion *et al.*, 1992).



Figure 3 : Photographie d'*Ulva* sp. collectée à Landrézac en mai 2018

## 4. Les marées vertes en Bretagne



**Figure 4 : Photographie d'une marée verte à ulves dérivantes sur la plage de Sainte Anne la Palud, Finistère (crédit photo : CEVA)**

Certaines espèces d'algues sont devenues envahissantes et prolifèrent en France, principalement le long des côtes bretonnes.

Une marée verte (Figure 4) aussi appelée « bloom algal » correspond à une accumulation d'algues vertes principalement du genre *Ulva* qui finissent par s'échouer sur les côtes suite aux vents et marées (Charlier *et al.*, 2007). Ces marées vertes sont apparues dans les années 1970 et sont annuelles.

En Bretagne, sur l'ensemble des années (2002-2018), les échouages d'ulves augmentent fortement entre mai et juillet et diminuent de juillet à octobre (Figure 5A). Les marées vertes d'*Ulva* sp. touchent principalement les côtes du Morbihan, du Finistère et des Côtes d'Armor (Figure 5B).

La marée verte est issue du développement anormal de l'algue suite à des apports excédentaires en nutriments azotés et phosphatés appelé eutrophisation du milieu marin (Charlier *et al.*, 2007 ; Gao *et al.*, 2017). L'azote est considéré comme le facteur limitant qui conditionne la prolifération d'*Ulva*. En effet, une corrélation a été mise en évidence entre l'importance des marées vertes et les flux d'azote sur la période mai-août (Ballu, 2015).

Les marées vertes dans les baies sableuses de Bretagne résultent de différents facteurs. Les facteurs physiques, géomorphologiques et hydrodynamiques (lumière indispensable à la photosynthèse, faible profondeur d'eau, faible turbidité et faible renouvellement de l'eau, température comprise entre 10 et 20°C) permettent la rétention des nutriments et des algues. À ces facteurs s'ajoute un apport excessif en nutriments azotés *via* les rivières, en provenance des épandages agricoles, et en nutriments phosphatés issus des activités industrielles et urbaines (Fort *et al.*, 2020).

Les échouages d'*Ulva* sp. sont de trois types (Ballu, 2015) :

- Les **marées vertes à ulves dérivantes** qui correspondent à des échouages monospécifiques d'*Ulva* sp. avec une forte production et reconduction annuelle en raison de stocks résiduels faits en hiver.
- Les **marées vertes d'arrachage** qui correspondent à des échouages régulièrement mixtes où une partie importante de la biomasse s'est constituée alors que les ulves étaient fixées aux substrats rocheux.
- Les **marées vertes de vasière** qui ont des algues peu mobiles avec un effet colmatant sur le sédiment. Les thalles sont piégés dans la vase.



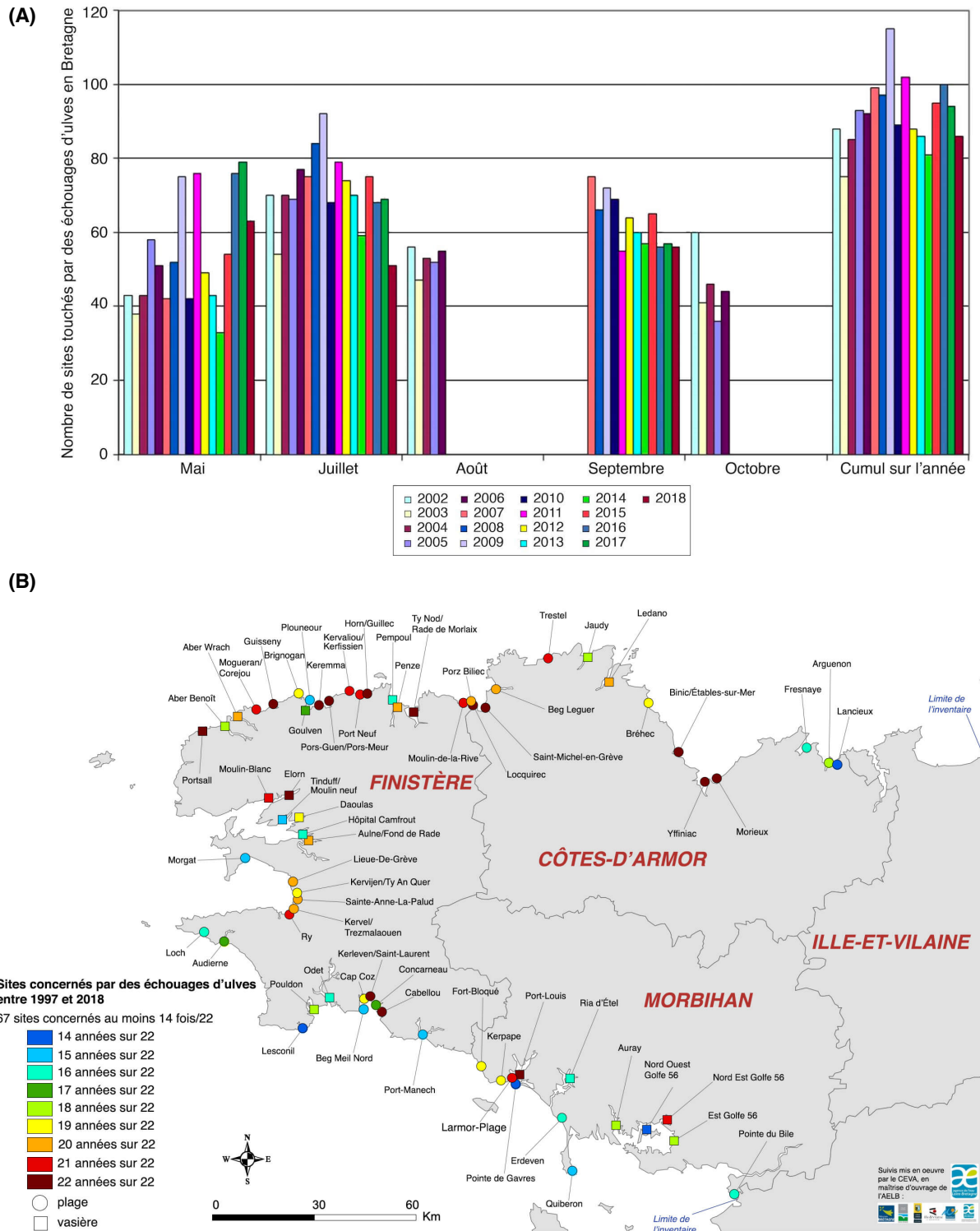


Figure 5 : (A) Dénombrement des sites touchés par des échouages d'ulves en Bretagne de 2002 à 2018 en fonction de la saison et (B) Sites les plus fréquemment touchés par des échouages d'ulves en Bretagne de 1997 à 2018

Modifié d'après CEVA (2018).

La composition biochimique d'*Ulva* sp., notamment en polysaccharides et en ulvanes rend cette algue proliférative d'autant plus intéressante dans le cadre de sa valorisation face aux enjeux environnementaux, économiques et sociétaux majeurs (Charlier *et al.*, 2007).

## B. Les macroalgues : sources de polysaccharides

---

Les macroalgues sont constituées essentiellement d'eau, jusqu'à 90% de leur poids. La composition biochimique des algues dépend de leur stade de développement et du cycle de croissance mais également de leur écosystème (taux et types d'éléments nutritifs, température, intensité lumineuse, salinité). Il existe donc une importante variabilité de la composition biochimique en fonction des espèces, des saisons, des conditions de croissance et de stress (Rindi *et al.*, 2012). D'autres paramètres inhérents à l'exploitation de l'algue comme le mode de collecte, de séchage et les méthodes d'analyses employées impactent la composition biochimique étudiée des algues (Bourgougnon *et al.*, 2021).

On distingue deux métabolismes chez l'algue, le primaire et le secondaire. Les **métabolites primaires** sont des composés vitaux à la survie, à la reproduction et au bon fonctionnement de l'algue et comprennent les lipides, les protéines, les glucides, les minéraux et les vitamines. Les **métabolites secondaires** n'interviennent pas dans le développement ou la maintenance de l'organisme. Ils sont généralement synthétisés en cas de stress biotique ou abiotique comme les composés phénoliques ou halogénés (Kornprobst, 2005).

### 1. Composition générale en métabolites primaires

Les **lipides**, sont principalement constitués de chaînes carbonées, et ont plusieurs rôles : de structure (constituants des membranes cellulaires avec la bicouche phospholipidique), de réserve énergétique, de messagers cellulaires et de substrats métaboliques. Les lipides et Acides Gras (AG) sont présents en faible quantité dans les macroalgues, entre 1 et 5% du poids sec.

Néanmoins, leur contenu en Acides Gras PolyInsaturés (AGPI), tels que l'acide docosahexaénoïque (C22 : 6 n-3), l'acide eicosapentaénoïque (C20 : 5 n-3), l'acide  $\alpha$ -linoléique (C18 : 4 n-3) et l'acide arachidonique (C20 : 4 n-6), largement représentés par les oméga-3 et 6 (puissants antioxydants), est supérieur à celui des végétaux terrestres. Les AGPI représentent pour ainsi dire la moitié du contenu en lipides des algues (Kendel *et al.*, 2015 ; Fleurence & Levine, 2016 ; Terme *et al.*, 2019). Les stérols, principalement représentés par le fucostérol, le clionastérol, l'isofucostérol et le cholestérol, sont également synthétisés par les algues (Lopes *et al.*, 2013).

Les **protéines** peuvent atteindre jusqu'à 50% du poids sec de l'algue. Les algues rouges possèdent le taux de protéines le plus élevé (20 à 50% du poids sec) comparé aux algues vertes (9 à 33% du poids sec) et brunes (3 à 15% du poids sec) (Fleurence *et al.*, 2018). La composition en protéines et le profil d'acides aminés des algues varient en fonction du phylum. Toutefois, les protéines algales présentent les acides aminés classiques (acides aminés essentiels et non essentiels), en particulier la glycine (Gly), l'alanine, l'arginine, la proline (Pro), les acides glutamique et aspartique. D'autres acides aminés comme la valine, la leucine, la lysine sont également trouvés en plus faible concentration (Fleurence & Levine, 2016). Les algues possèdent également des composés azotés autres que protéines, peptides et acides aminés. Cette azote non protéique se trouve dans les pigments, nitrates, nitrites et ions ammonium (Dawczynski *et al.*, 2007).

Les **sucre**s ou **glucides** des macroalgues sont davantage décrits dans le paragraphe suivant puisque l'algue se compose principalement de polysaccharides pariétaux et de stockage, représentant jusque plus de 50% du poids sec de l'algue (Deniaud-Bouët *et al.*, 2014).

Les **minéraux** sont des composés inorganiques, représentant entre 8 à 40% du poids sec de l'algue (Rupérez, 2002). Ils sont indispensables à leur survie et interviennent comme catalyseurs d'étapes de la photosynthèse. La plupart des algues ont un contenu élevé en calcium, fer, cuivre, et sodium, magnésium, phosphore et potassium. Le sodium, potassium, magnésium, phosphore et calcium sont des macroéléments.

Les **vitamines** sont des macronutriments organiques ayant de nombreux effets catalytiques sur des réactions métaboliques. Les algues synthétisent des vitamines hydrosolubles (vitamine C et B) et liposolubles (vitamine E et caroténoïdes, provitamines de la vitamine A). Les vitamines A, C et E sont couramment connues pour leur activité antioxydante (Škrovánková, 2011).

## 2. Les polysaccharides des macroalgues

Le contenu total en polysaccharides des algues varie entre 4 et 76% du poids sec (Holdt & Kraan, 2011). La composition des algues vertes en sucres est globalement estimée à 35% du poids sec de l'algue (Kim & Chojnacka, 2015). Les polysaccharides représentent jusqu'à 65% du poids sec pour le genre *Ulva* (Holdt & Kraan, 2011).

Au printemps/été, la paroi d'*Ulva* sp. contient davantage de polysaccharides. L'augmentation de la teneur en polysaccharides de l'algue est directement corrélée à son cycle de croissance et à l'augmentation de luminosité et de chaleur. Les polysaccharides apportent force et flexibilité à l'algue, permettent de maintenir l'équilibre ionique et préviennent de la dessiccation (Kim & Chojnacka, 2015).

Les sucres, issus de la photosynthèse, présents dans les algues peuvent être de deux types :

- Les **saccharides** (sucres simples) : mono- ou disaccharides qui sont caractérisés par un faible Poids Moléculaire (PM) et une solubilité dans l'eau (exemple : glucose, galactose, fucose, floridoside, ribose).
- Les **polysaccharides** (sucres complexes) : homopolysaccharides (ex : cellulose, amidon) ou hétéropolysaccharides (ex : ulvanes, agars, carraghénanes, alginates) qui sont des biopolymères constitués de monomères de sucres liés par liaison glycosidique.

Les polysaccharides algaux sont eux-mêmes regroupés en deux catégories : les **polysaccharides de réserve** et les **polysaccharides pariétaux**, eux-mêmes segmentés en polysaccharides de la **phase matricielle** et de la **phase fibrillaire** (ou squelettique) (Figure 6).

La nature de la paroi et des sucres de stockage varie selon l'algue. Cette diversité des polysaccharides rend les algues chimiquement et structurellement plus complexes et hétérogènes que les plantes terrestres (Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016).

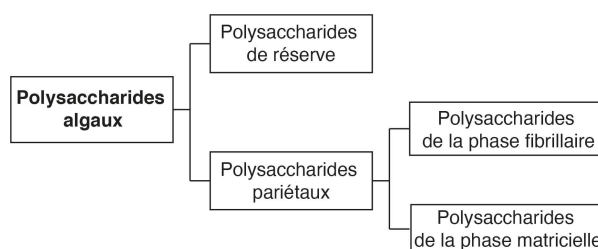


Figure 6 : Classification des polysaccharides algaux

### a) Polysaccharides de réserve

Les polysaccharides de réserve résultent principalement de la photosynthèse. Stockés dans les plastes algaux, ils sont utilisés afin de maintenir le métabolisme de base (Rioux & Turgeon, 2015).

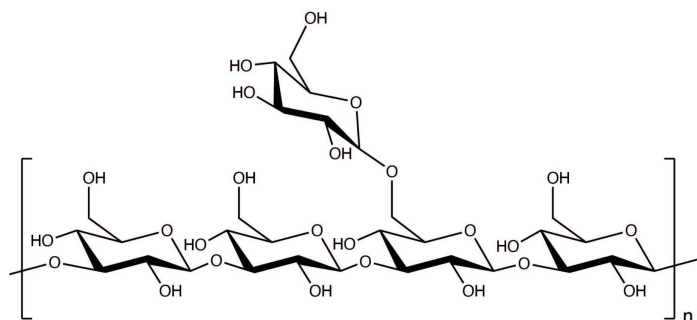


Figure 7 : Structure chimique de la laminarine

La **laminarine**, principal glucide de stockage chez les **algues brunes** est un **β-glucane** composé principalement d'unités de β-(1,3)-D-glucopyranose, ramifié avec du β-(1,6)-D-glucopyranose et du β-(1,2)-D-glucopyranose (Figure 7) (Mian & Percival, 1973 ; Rioux & Turgeon, 2015 ; Kadam *et al.*, 2015).

La laminarine, de faible PM (5 à 7 kDa), est stockée dans une vacuole, à l'intérieur des chloroplastes. Le mannitol, polyol à 6 carbones, peut également être présent comme composé de stockage chez les algues brunes et représente jusque 20 à 30% du poids sec de l'algue (Rioux & Turgeon, 2015).

L'**amidon floridéen** est le composé principal de réserve des **algues rouges de Florideophyceae**.

Il s'agit d'un amidon ne contenant pas d'amylose.

Il est sous forme de granules semi-cristallines de petite taille (0,5 à 25 μm de diamètre) libres dans le cytoplasme (Viola *et al.*, 2001). Ce polymère est constitué d'**α-(1,4)-D-glucane**, c'est-à-dire, d'unités de D-glucose liées entre elles par des liaisons osidiques en α-1,4 (chaîne de base de 15 résidus de glucose), et possède également des embranchements en α-(1,6) (Figure 8) (Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016).

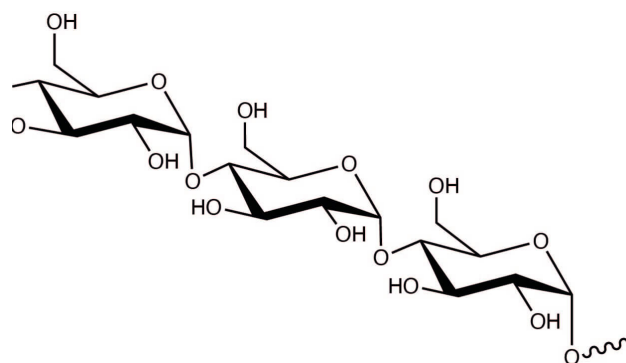


Figure 8 : Structure de base de l'amidon floridéen

D'autres glucides de bas PM comme le floridoside (2-O-α-D-galactopyranosylglycérol) ou l'isofloridoside (1-α-D-galactopyranosyl-(D ou L)-glycérol), ou le digénéaside (2-O-α-D-mannopyranosyl-D-acide glycérique) sont également présents chez les algues rouges (Eggert & Karsten, 2010 ; Pade *et al.*, 2015). Par exemple, le floridoside est considéré comme le principal glucide de faible PM contenu dans le cytoplasme de l'algue *Solieria chordalis* (Bondu, 2009).

Les **algues vertes** appartenant au genre *Ulva* contiennent dans le plaste, de l'**amidon**, polymère d'**amylose** ou de glucane **amylopectine-like**, comme composé de stockage majoritaire, sous forme de grains (Robic *et al.*, 2009a ; Prabhu *et al.*, 2019). L'amylose se trouve sous forme de micelles hydratées (résidus de glucose liés en α-(1,4)) et le glucane « amylopectine-like » comporte des ramifications en α-(1,6) tous les 12 résidus de glucose environ.

## b) Polysaccharides pariétaux

La paroi représente plus de 50% du poids sec de l'algue. Les parois des algues vertes, rouges et brunes présentent des architectures et des composants uniques, complexes, associant des polysaccharides sulfatés et ramifiés ainsi que des protéines et des ions (MacArtain *et al.*, 2008 ; Domozych *et al.*, 2012).

La nature et le type de constituants de la paroi des algues confèrent des propriétés particulières. La paroi polysaccharidique joue, en effet, un rôle à la fois structural et protecteur. D'un point de vue mécanique, la résistance à la déformation des thalles tient essentiellement aux liaisons établies entre les constituants de la matrice, alginates chez les *Phaeophyceae*, et galactanes chez les *Rhodophyta*. Sa structure semi-rigide forme une armature résistante qui permet de soutenir l'organisme et de résister à la pression osmotique. Ainsi, les polysaccharides sulfatés facilitent la rétention d'eau et ionique dans les matrices extracellulaires, pour faire face à la dessiccation et au stress osmotique à marée basse. La paroi joue aussi un rôle lors de la croissance et du développement de l'organisme. Toujours en contact avec le milieu extérieur, elle sert d'interface entre le végétal et son environnement. Elle est ainsi le siège de phénomènes de perception/signalisation et est en première ligne lors des réactions de défense face à des stress biotiques (herbivores, pathogènes, etc.) ou abiotiques (rayonnement ultraviolet, dessiccation, etc.) (Ficko-Blean *et al.*, 2015 ; Bourgougnon *et al.*, 2021).

La paroi algale est constituée de deux phases, l'une dite **matricielle (amorphe)**, chargée, prédominante et l'autre **fibrillaire (squelettique ou cristalline)**, neutre, constituée de microfibrilles (Tableau II).

**Tableau II : Polysaccharides pariétaux d'algues**

Modifié d'après Popper *et al.* (2011), Rioux & Turgeon (2015), Stiger-Pouvreau *et al.* (2016), Deniaud-Bouët *et al.* (2017) et Zhong *et al.* (2020).

	<i>Chlorophyta</i>	<i>Rhodophyta</i>	<i>Phaeophyceae</i>
<b>Polysaccharides fibrillaires/insolubles</b>	Cellulose	Cellulose	Cellulose
		$\beta$ -(1,4)-D-mannane	
		$\beta$ -(1,4)-D-xylane	
		$\beta$ -(1,3)-D-xylane	
<b>Hémicelluloses</b>	Xyloglucane	Glucomannane	Xylofucoglucane
	$\beta$ -D-mannane	Mannane	Xylofucoglucuronane
	Glucuronane	$\beta$ -(1,3)- et $\beta$ -(1,4)-xylane	$\beta$ -(1,3)-glucane
	$\beta$ -(1,3)-glucane	$\beta$ -(1,3)- et $\beta$ -(1,4)-glucane	
<b>Polysaccharides carboxyliques matriciels</b>	Ulvane	/	Alginate
			$\alpha$ -L-acide guluronique
			$\beta$ -D-acide mannuronique
<b>Polysaccharides sulfatés matriciels</b>	Ulvane	Agar	Polysaccharides sulfatés
	Arabinogalactane	Carraghénane	riches en fucose
		Porphyrane	
		$\alpha$ -(1,3)- et $\beta$ -(1,4)-galactane	

i. La phase fibrillaire

La **phase fibrillaire** est commune à l'ensemble des macroalgues et se compose majoritairement des polysaccharides structurels insolubles comme la **cellulose**, l'**hémicellulose**, le **xyloglucane** (polysaccharide proche de la cellulose, composé d'unités de D-xylose), le **mannane** et le **glucuronane** (Kloareg & Quatrano, 1988 ; Lahaye *et al.*, 1994 ; Ray & Lahaye, 1995 ; Ray, 2006 ; Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016).

La cellulose est un polymère avec des unités de glucose liées en  $\beta$ -(1,4). Dans la paroi, les chaînes de cellulose sont organisées en microfibrilles dont le diamètre varie en fonction du taxon et contrôle ainsi les propriétés physiques de la paroi (Popper *et al.*, 2011). La cellulose compose jusque 70% de la paroi des *Chlorophyta* contre moins de 20% pour les *Phaeophyceae* et moins de 9% pour les *Rhodophyta* (Kloareg & Quatrano, 1988 ; Rioux & Turgeon, 2015).

La cellulose peut être remplacée par des xylanes (microfibrilles composées de  $\beta$ -(1,3) ou  $\beta$ -(1,4)-D-xylose) chez les algues vertes et rouges, ou des mannanes (courtes tiges fibrillaires composées de  $\beta$ -(1,4)-D-mannose) chez les algues rouges.

ii. La phase matricielle

La **phase matricielle** des macroalgues est spécifique à chaque espèce, complexe, et est majoritairement constituée d'un réseau de polysaccharides dans lequel s'imbrique des protéines. Seulement certains polysaccharides matriciels sont complètement caractérisés (Tableau III).

**Tableau III : Polysaccharides majoritaires de la phase matricielle des macroalgues**

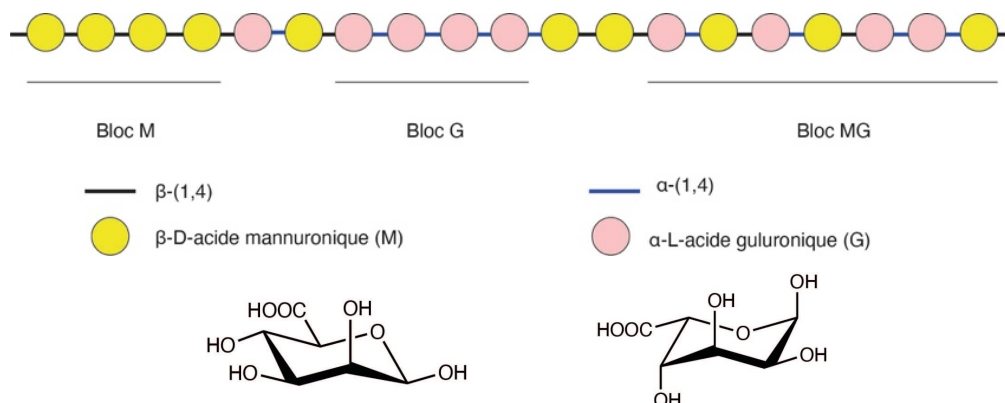
	<b>Polysaccharides</b>	<b>Composition monosaccharidique</b>
<i>Phaeophyceae</i>	Alginates	$\alpha$ -L-guluronate ; $\beta$ -D-mannuronate
	Polysaccharides sulfatés riches en fucose	$\alpha$ -L-fucose ; D-galactose ; mannose ; xylose ; acide glucuronique
<i>Rhodophyta</i>	Agars	$\alpha$ -L-galactopyranose ; 3,6-anhydrogalactose
	Carraghénanes	
<i>Chlorophyta</i>	Ulvanes (glucuronoxylorhamnanes)	L-rhamnose ; D-xylose ; acide D-glucuronique ; acide L-iduronique
	Xyloarabinogalactanes	D-xylose ; L-arabinose ; D-galactose

Les polysaccharides solubles principaux des **algues brunes** sont les **alginates** et les **polysaccharides sulfatés riches en fucose** (Tableau III) (Deniaud-Bouët *et al.*, 2017) représentant près de 45% du poids sec de l'algue (Kloareg & Quatrano, 1988).

Les alginates sont les principaux polysaccharides de la paroi des algues brunes. Ils confèrent la flexibilité aux algues, empêchent la dessiccation et interviennent dans l'échange d'ions (calcium et magnésium) avec l'eau de mer (Kloareg & Quatrano, 1988). Ce polysaccharide linéaire, de 150 à 1700 kDa, se compose d'acide  $\beta$ -D-mannuronique et d'acide  $\alpha$ -L-guluronique liés en  $\beta$ -(1,4) ou  $\alpha$ -(1,4). En général, le ratio d'acide mannuronique et guluronique est de 1 : 1 (Holdt & Kraan, 2011 ; Rioux & Turgeon, 2015 ; Wells *et al.*, 2017). Les alginates comportent des zones composées uniquement d'acide  $\alpha$ -L-guluronique (bloc G), de fractions riches en acide  $\beta$ -D-mannuronique (bloc M), et de zones alternant les deux types d'acide (bloc MG) (Figure 9).



Ces polysaccharides anioniques forment une gomme visqueuse en milieux aqueux, et ont une forte capacité d'absorption de l'eau (Venkatesan *et al.*, 2015). Le mécanisme de gélification de l'alginate est décrit par le modèle de la boîte à œufs. Cela consiste en la réticulation des chaînes d'alginate par incorporation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans la structure des blocs G. La longueur des blocs G est donc la principale caractéristique structurelle contribuant à la formation du gel et à sa force (Braccini & Pérez, 2001).

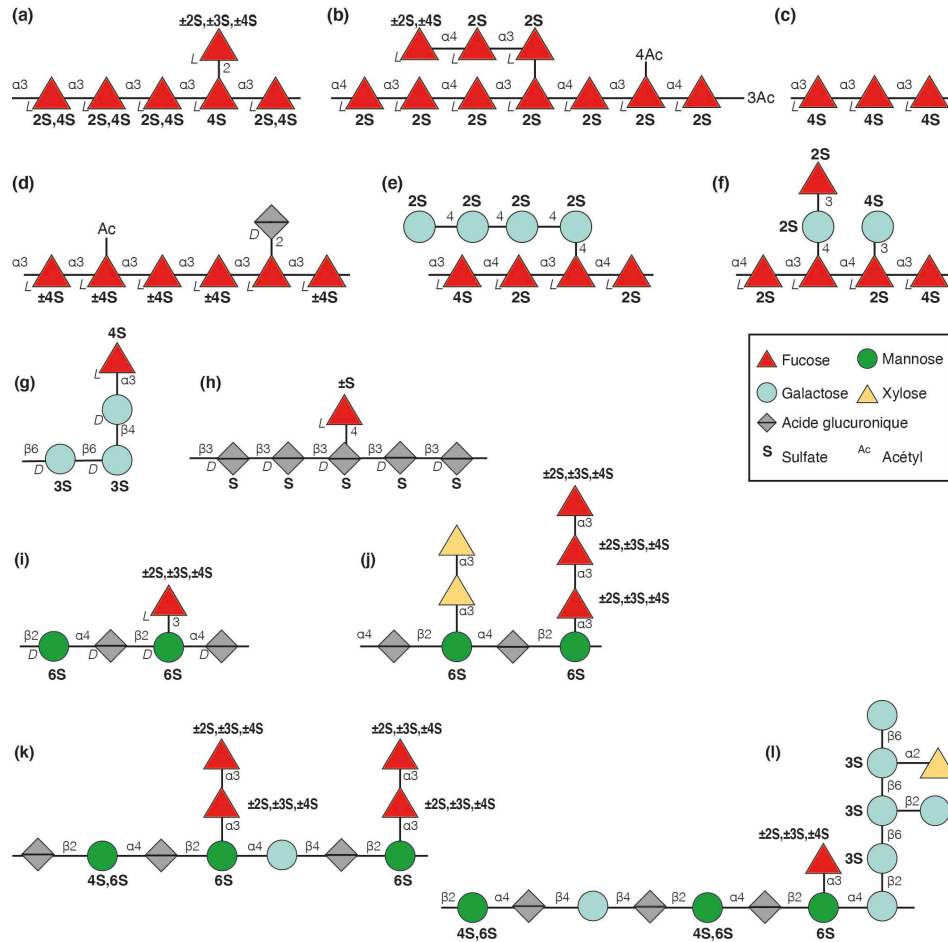


**Figure 9 : Structure moléculaire de l'alginate**

Modifiée d'après Alba & Kontogiorgos (2019).

La paroi des Fuciales (algues brunes) correspond majoritairement à un assemblage de deux réseaux, le premier étant composé de polysaccharides riches en fucose liés à des glucanes, intégré dans un second réseau constitué d'alginate. Les polysaccharides sulfatés de la paroi des algues brunes jouent probablement un rôle clé dans l'adaptation au stress osmotique (Deniaud-Bouët *et al.*, 2014).

Les polysaccharides riches en fucose des algues brunes ont des structures complexes et variées. Ils comprennent des molécules d'homofucane hautement sulfatées ainsi qu'une variété de polysaccharides hautement ramifiés, allant de polymères à haute teneur en acides uroniques, à faible teneur en sulfates avec des proportions significative de xylose, galactose, mannose et rhamnose (Figure 10). Les fucanes sulfatés correspondent à des polysaccharides avec une structure de squelette à base de résidus de α-L-fucose sulfatés. En effet, les fucanes sulfatés se composent soit de résidus de (1,3)-L-fucose portant un ou deux sulfates en positions C2 et C4, soit d'une alternance de résidus de (1,3)- et (1,4)-L-fucose portant un sulfate en C2 ou en C4 (Figure 10a,b,c,d). Les galactofucanes contiennent en proportions relativement égales des unités de L-fucose et D-galactose, et se caractérisent par leur richesse en D-galactose (> 50%) (Figure 10e,f). Les fucogalactanes ou sargassanes se composent d'un squelette de base riche en galactose, mais aussi en acide glucuronique et mannose, et de chaînes latérales riches en résidus de fucose, partiellement sulfatés (Figure 10g). Les fucoglucuronanes ou ascophyllanes correspondent à des chaînes d'acides mannuroniques liés à des résidus de fucose (Figure 10h). Les fucoïdanes font référence à des hétéropolymères avec des squelettes plus diversifiés pouvant être basés sur des sucres neutres ou des résidus d'acides uroniques (Figure 10k,l) (Rioux & Turgeon, 2015 ; Deniaud-Bouët *et al.*, 2017).



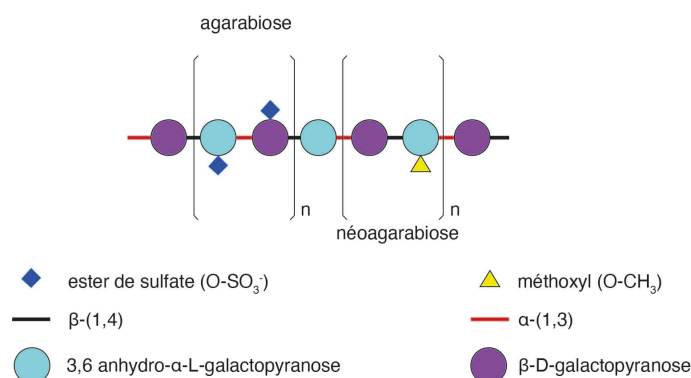
**Figure 10 : Structures moléculaires de polysaccharides riches en fucose**

(a) structure des fucanes des espèces de Laminariales ; (b) structure des fucanes des espèces de Fucales ; (c) structure très régulière des fucanes des Fucales *Himantalia elongata* ; (d) structure de fucanes des Ectocarpales ; (e,f) structures de galactofucanes ; (g) fucogalactanes, anciennement appelés sargassanes ; (h) fucoglucuronanes, anciennement appelés ascophyllanes ; (i,j) (xylo)fucoglucuronmannanes ; (k,l) structures simplifiées des fucoïdanes. Modifié d'après Deniaud-Bouët *et al.* (2017).

La phase matricielle des **algues rouges** contient une grande quantité de polysaccharides. Elle se compose essentiellement de galactanes sulfatés (environ 70% des constituants de la paroi) divisés en deux groupes : les **agars** et les **carraghénanes** selon leur stéréochimie (résidus  $\alpha$ -L-galactose pour les agars et  $\alpha$ -D-galactose pour les carraghénanes) (Tableau III).

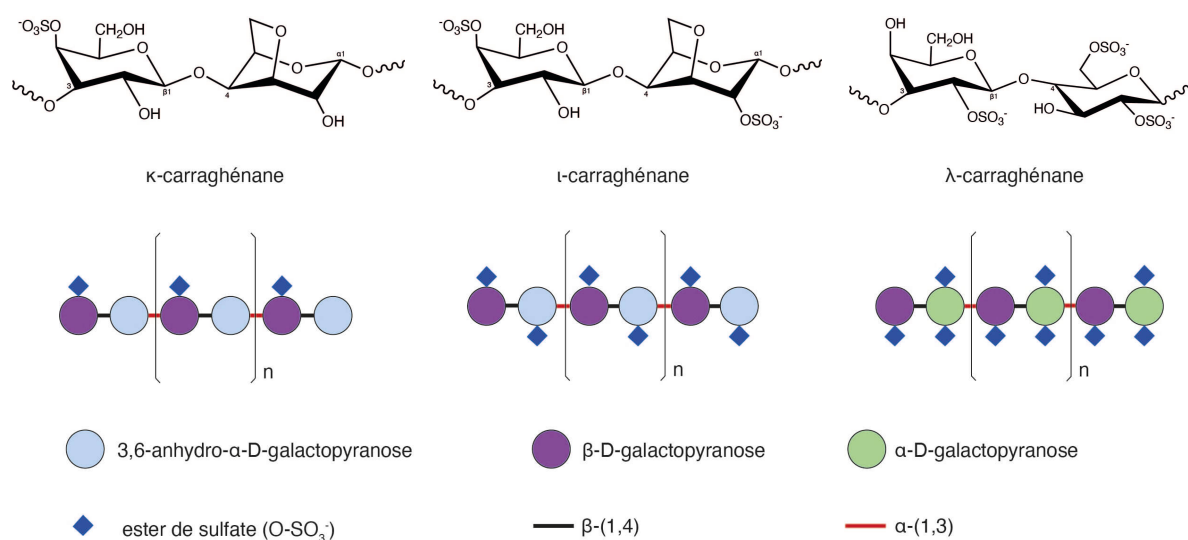
L'agar est un polysaccharide linéaire de haut PM qui se compose d'esters de sulfate de calcium, magnésium, potassium et sodium d'unités D- et L-galactose, liées par une alternance d'unités d' $\alpha$ -(1,3)-D-galactose et de  $\beta$ -(1,4)-D-galactose (Figure 11) (Lahaye & Rochas, 1991 ; Stainley, 2006). Les agars moins riches en groupements sulfates (< 4,5%) peuvent présenter d'autres groupements tels que des méthoxyles, des pyruvates ou des esters sulfatés rendant ainsi le polysaccharide hétérogène (Garon-Lardièrre, 2004 ; Rioux & Turgeon, 2015). Les agars peuvent être divisés en deux sous-groupes : agarose et agaropectine. L'agarose est un polysaccharide neutre et linéaire tandis que l'agaropectine est un polysaccharide acide portant des groupements sulfates, méthyles ou méthyles pyruvates (Lahaye & Rochas, 1991). La viscosité des agars est plus faible que celles des carraghénanes en raison de la présence de groupes faiblement chargés comme les sulfates (Stainley, 2006).





**Figure 11 : Structure moléculaire de l'agar**  
Modifiée d'après Alba & Kontogiorgos (2019).

Les carraghénanes sont des galactanes sulfatés de haut PM composés d'unités disaccharidiques liées de α-(1,3)- et β-(1,4)-D-galactopyranose ou 3,6-anhydrogalactose (Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016). Un ou deux groupements sulfates se trouvent sur l'unité galactose en position 2 et/ou 6. Selon la teneur en 3,6-anhydrogalactose, la position et le nombre de groupements sulfates, les carraghénanes sont classés en différents types et une quinzaine de structures sont identifiées et assignées par des lettres grecques (ex : κ, λ, ι, ν, μ, θ) (Garon-Lardièrre, 2004 ; Alba & Kontogiorgos, 2019). Ces variations structurales influent sur les propriétés d'hydratation, de résistance, de texture et de température de formation du gel. Les principales structures du carraghénane sont les formes kappa (κ), iota (ι) et lambda (λ) (Figure 12) (Rioux & Turgeon, 2015).



**Figure 12 : Structures moléculaires des carraghénanes**  
Modifiée d'après Alba & Kontogiorgos (2019).

Les polysaccharides sulfatés de la phase matricielle des **algues vertes** sont classés en deux groupes (Percival, 1979) : (1) les **xyloarabinogalactanes sulfatés** et (2) les **glucuronoxylorhamnanes** et les **glucuronoxylorhamnogalactanes sulfatés** (Tableau III).

Les xyloarabinogalactanes contiennent de faibles teneurs en acides uroniques et rhamnose, mais de fortes teneurs en D-galactose, L-arabinose et parfois D-xylose. Ces polysaccharides sont particulièrement présents chez les algues du genre *Caulerpa*, *Codium* et *Bryopsis* (Chattopadhyay *et al.*, 2007 ; Estevez *et al.*, 2009 ; Ciancia *et al.*, 2012).

Les glucuronoxylorhamnanes et les glucuronoxylorhamnogalactanes sulfatés, aussi appelés **ulvanes**, sont des polysaccharides anioniques riches en acides uroniques, contenant aussi du L-rhamnose, du D-xylose et parfois du galactose. Les groupements sulfates sont présents sur les sous-unités rhamnose et xylose dans les glucuronoxylorhamnanes. Ces polysaccharides sont majoritairement représentés chez le genre *Ulva* (Lahaye & Ray, 1995).

### 3. Les ulvanes : polysaccharides pariétaux majoritaires d'*Ulva* sp.

#### a) Structure et composition des ulvanes

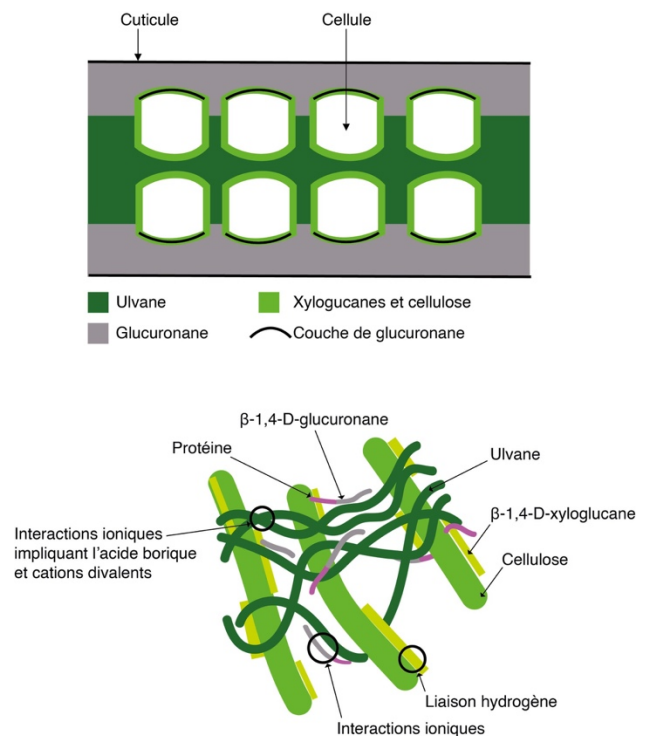
Un schéma de la structure de la paroi des ulves est représenté sur la Figure 13.

Comme évoqué précédemment chez les algues vertes, la phase squelettique de la paroi d'*Ulva* sp. se compose de **celluloses** et d'**hémicelluloses**,  **$\beta$ -(1,4)-D-xyloglucanes** et  **$\beta$ -(1,4)-D-glucuronanes** (Lahaye *et al.*, 1994 ; Lahaye & Robic, 2007). Les xyloglucanes et glucuronanes sont des polysaccharides solubles et des constituants relativement mineurs dans la paroi polysaccharidique. Aussi, les polysaccharides matriciels sulfatés des ulves sont les xyloarabinogalactanes sulfatés et les glucuronoxylorhamnogalactanes ou glucuronoxylorhamnanes sulfatés aussi appelés **ulvanes** (Tableau III) (Lahaye & Robic, 2007). Ils représentent environ 10 à 50% du poids sec de l'algue (Wang *et al.*, 2014a).

Les ulvanes de la paroi des algues vertes du genre *Ulva* peuvent également être liés aux protéines. Ces protéines peuvent représenter jusqu'à 33% du poids sec de l'algue *Ulva* sp. (Fleurence *et al.*, 2018). Les ulvanes eux représentent jusqu'à 45% du poids sec des polysaccharides de la paroi (Robic *et al.*, 2008 ; Kidgell *et al.*, 2019). Ces polymères linéaires hydrosolubles ont des PM élevés (entre 100 et 9000 kDa) et ont tendance à former des micro-agrégats.

#### i. Composition des ulvanes

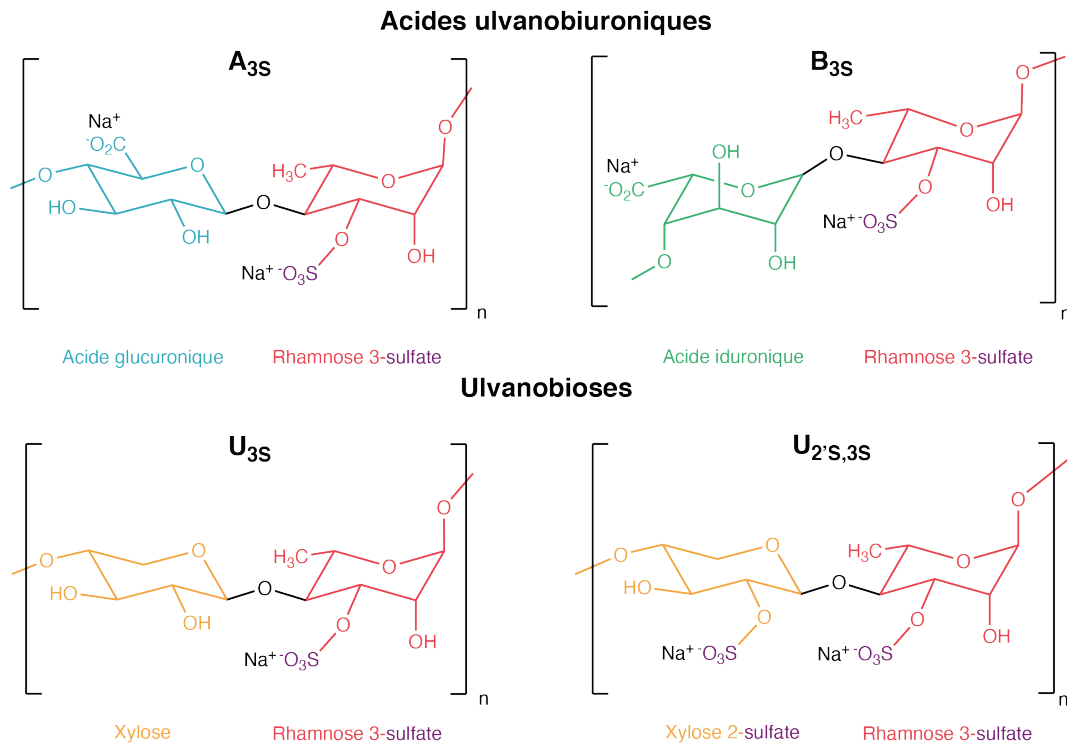
La composition des ulvanes varie en fonction de plusieurs facteurs comme la période de collecte, les conditions de croissance écophysiological, les origines taxonomiques et le traitement post-collecte des algues (Robic *et al.*, 2009a).



**Figure 13 : Schéma de l'organisation structurale de la paroi de l'algue verte *Ulva* sp.**  
Modifié d'après Lahaye & Robic (2007).

Leurs constituants majoritaires sont des **monosaccharides** dont le rhamnose (5,0 – 92,2%mol sucres totaux, Rha), le xylose (0,0 – 38,0%mol sucres totaux, Xyl), les acides uroniques dont l'acide glucuronique (2,6 – 52,0%mol sucres totaux, GlcA) et l'acide iduronique (0,6 – 15,3%mol sucres totaux) et des **groupements sulfates** (16,0 – 23,2% du poids sec) (Kidgell *et al.*, 2019).

Les groupements sulfates sont situés uniquement sur le rhamnose et le xylose pour former respectivement du L-rhamnose-3-sulfate et du D-xylose-2-sulfate (Figure 14). Les ulvanes sont des polysaccharides anioniques hautement chargés en raison de la présence de groupements carboxyliques et sulfates.



**Figure 14 : Sous-unités disaccharidiques majeures des ulvanes**  
Modifié d'après Lahaye & Robic (2007) et Kidgell *et al.* (2019).

ii. Structure des ulvanes

Le squelette des ulvanes est le plus souvent composé de monosaccharides liés en  $\alpha$ - et  $\beta$ -(1,4) avec des unités disaccharidiques répétitives caractéristiques. Les deux principales unités disaccharidiques répétées sont les **acides ulvanobiurioniques** et les **ulvanobioses** (Figure 14) (Lahaye *et al.*, 1999 ; Lahaye & Robic, 2007).

Les acides ulvanobiurioniques aussi appelés aldobiurioniques sont majoritaires. On distingue l'**acide ulvanobiurionique-3-sulfate type A** ( $A_{3S}$ ) et l'**acide ulvanobiurionique-3-sulfate type B** ( $B_{3S}$ ) (Figure 14). L'acide ulvanobiurionique type  $A_{3S}$  est l'une des unités disaccharidiques les plus communes et se compose d'acide  $\beta$ -D-glucuronique lié en (1,4) au  $\alpha$ -L-rhamnose-3-sulfate. L'acide ulvanobiurionique type  $B_{3S}$  se compose d'acide  $\alpha$ -L-iduronique (un épimère C-5 de l'acide glucuronique) lié au  $\alpha$ -(1,4)-L-rhamnose-3-sulfate. L'acide ulvanobiurionique-2'-acide glucuronique-3-sulfate de type A ( $A_{2G,3S}$ ) correspond à des sous-unités d'acide glucuronique créant des ramifications au niveau du rhamnose-3-sulfate dans les  $A_{3S}$  (Quemener *et al.*, 1997 ; Lahaye *et al.*, 1999).

Les ulvanobioses type U sont minoritaires. Des résidus xylose partiellement sulfatés peuvent être présents au lieu de l'acide uronique, on parle alors d'**ulvanobiose-3-sulfate** ( $U_{3S}$ ) pour un xylose non sulfaté, et d'**ulvanobiose-2',3-disulfate** ( $U_{2'S,3S}$ ), pour un xylose sulfaté (Figure 14). L'ulvanobiose  $U_{3S}$  consiste en du  $\beta$ -D-xylose lié au  $\alpha$ -(1,4)-L-rhamnose-3-sulfate alors que l'ulvanobiose  $U_{2'S,3S}$  correspond au  $\beta$ -D-xylose-2-sulfate lié au  $\alpha$ -(1,4)-L-rhamnose-3-sulfate (Ray & Lahaye, 1995).

iii. Biosynthèse des ulvanes

La voie de biosynthèse des ulvanes a été proposée en 2007 par Lahaye & Robic (Figure 15). Ainsi, la biosynthèse des ulvanes fait intervenir différentes enzymes comprenant principalement l' $\alpha$ -1,4-rhamnosyltransférase, la  $\beta$ -1,4-glucuronyltransférase, la glucosyltransférase, la  $\beta$ -1,4-xylosyl-transférase, la glucuronyl C5-épimérase, et la sulfotransférase (ST). Le précurseur nucléotidique de l'acide glucuronique (UDP-GlcA) provient soit de l'interconversion d'UDP-Glu soit de l'inositol, tandis que le précurseur nucléotidique du rhamnose peut être soit l'UDP-Rha soit le dTDP-Rha. L'UDP-Xyl est formé par interconversion de l'UDP-GlcA *via* des xyloses synthases. L'acide iduronique est lui formé par action d'une épimérase convertissant l'acide glucuronique. Les ramifications et sulfatations peuvent se produire de façon concomitante ou indépendante, et séquentielle à la polymérisation en chaîne et d'une manière concertée pour aboutir aux différents domaines de répétitions structuraux des ulvanes. La sulfatation des ulvanes par des sulfotransférases peut se produire soit dans l'appareil de Golgi soit directement dans la paroi cellulaire (Lahaye & Robic, 2007 ; Ficko-Blean *et al.*, 2015).

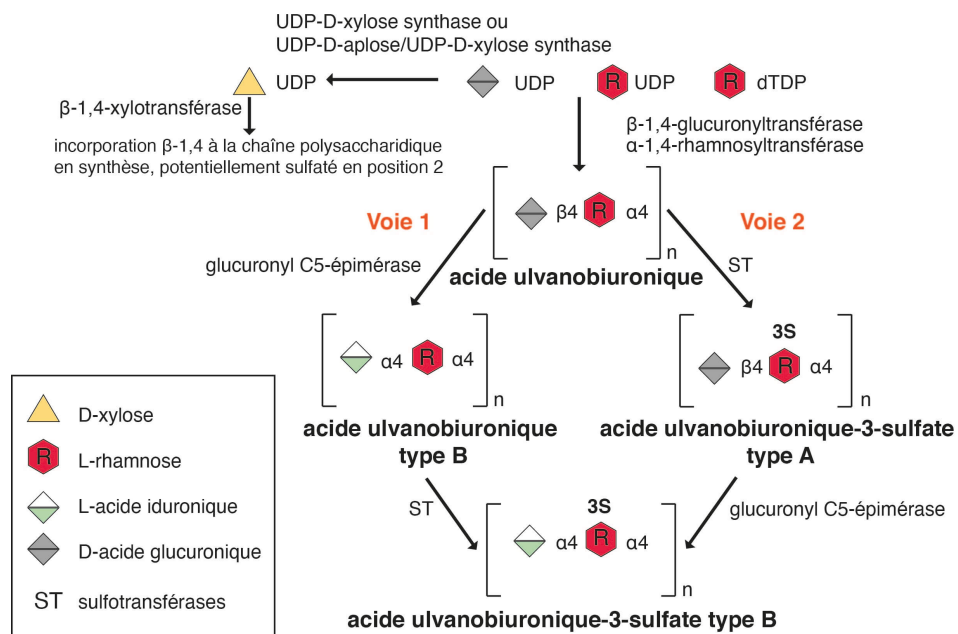
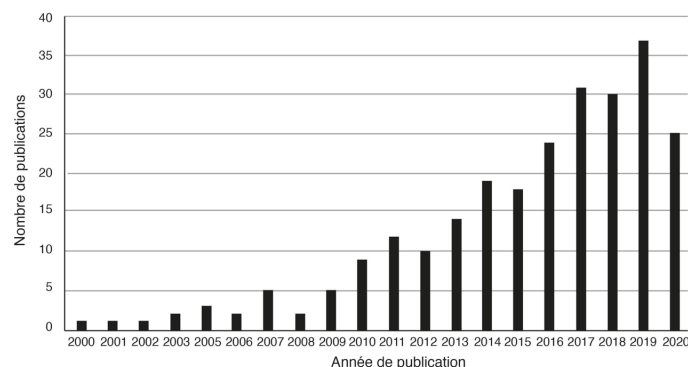


Figure 15 : Schéma hypothétique des voies de biosynthèse des ulvanes

UDP : uridine 5'-diphosphate ; dTDP : thymidine 5' diphosphate. Modifié d'après Lahaye & Robic (2007) et Ficko-Blean *et al.* (2015).

b) Extraction des ulvanes

Les ulvanes font l'objet d'un intérêt grandissant au vu du nombre de publications scientifiques qui augmentent depuis les années 2010 (multiplié par 2,5 en 10 ans) (Figure 16) (Mo'o *et al.*, 2020).



**Figure 16 : Nombre de publications scientifiques sur les ulvanes de 2000 à 2020**  
D'après Mo'o *et al.* (2020).

Les rendements quantitatifs et qualitatifs des ulvanes peuvent varier considérablement en fonction de la source de la biomasse (espèce, source sauvage ou cultivée, localisation géographique), du stockage de la biomasse collectée, du potentiel de traitement de pré-extraction (réduction du sel dans la biomasse par extraction à l'eau chaude), des conditions des procédés d'extraction (pH, température, temps d'extraction) ou des conditions de fractionnement et de purification (Kidgell *et al.*, 2019). La paroi constitue un obstacle à l'entrée de solvants (organiques ou aqueux) dans la cellule et limite l'efficacité des processus d'extraction mis en œuvre.

### i. Conditions générales de l'extraction

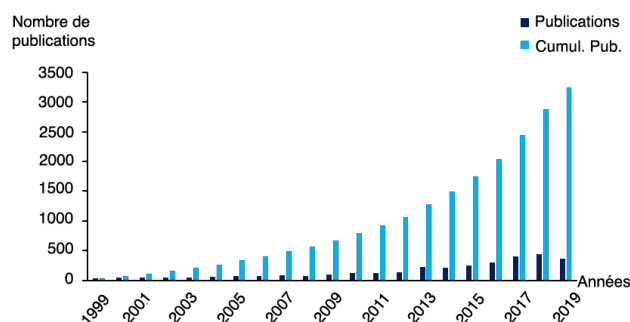
L'extraction des ulvanes avec de l'eau distillée est la méthode la plus employée et permet d'obtenir des rendements compris entre 25 et 40%. L'extraction par solutions aqueuses des ulvanes est souvent faite en présence d'agent chélatant cationique type oxalate d'ammonium acide ou basique, oxalate de sodium (Lahaye & Robic, 2007 ; Robic *et al.*, 2009b) afin de limiter l'extraction d'autres composés de la paroi cellulaire comme les protéines attachées à la paroi algale ou les « arabinogalactan proteins » appartenant aux glycoprotéines riches en hydroxyproline hautement glycosylées (90 à 98% w/v de sucres, principalement de l'arabinose, du rhamnose et des résidus d'acide glucuronique).

En général, les conditions d'extraction utilisées pour un haut rendement d'extraction des ulvanes sont une température de 80-90°C, un pH variant de 2 à 4,5, et une durée de 1 à 3 h (Mo'o *et al.*, 2020). Les extractions à l'acide avec 0,05 à 1% d'acide chlorhydrique (HCl) à un pH de 1,5 à 2 (rendement moyen de 15 à 45%) entraînent généralement une désulfatation tandis que les méthodes enzymatiques (rendement moyen de 15 à 47%) permettent de conserver les sulfates. Afin d'améliorer le rendement quantitatif des ulvanes, une précipitation alcoolique fait suite à l'extraction aqueuse (Mo'o *et al.*, 2020), en général, à l'éthanol pendant 24 heures à 4°C (Kidgell *et al.*, 2019).

### ii. L'Extraction Assistée par Enzyme, technologie d'extraction aqueuse innovante

De nouveaux procédés d'extraction comme l'Extraction Assistée par Enzyme (EAE), l'extraction assistée par microondes, les champs électriques pulsés, l'extraction par fluide supercritique, l'extraction avec l'eau subcritique ou l'extraction assistée par ultrasons font leur émergence et sont parmi les technologies d'extractions aqueuses innovantes les plus appliquées aux algues et mentionnées dans la littérature (Cheung, 1999 ; Heo *et al.*, 2003 ; Uy *et al.*, 2005 ; Zhao *et al.*, 2010 ; Kadam *et al.*, 2013 ; Goettel *et al.*, 2013).

Ces procédés se présentent comme des alternatives efficaces aux procédés conventionnels d'extraction comme la macération et, sont donc intéressants dans le cadre de l'extraction de métabolites algaux.



**Figure 17 : Aperçu de l'évolution des publications sur l'extraction assistée par enzyme appliquée aux algues**  
Modifié d'après Terme *et al.* (2020).

Historiquement, l'EAE a été appliquée aux algues afin de trouver un nouveau procédé écoresponsable pour l'extraction des phycocolloïdes. Depuis plus de vingt ans, la recherche et les procédés impliquant l'EAE sur les algues font face à un intérêt croissant (Terme *et al.*, 2020) (Figure 17).

Plus précisément, l'EAE permet l'extraction de composés d'intérêt sans utiliser de conditions dénaturantes (solvants ou températures élevées). Elle permet également d'éviter la production de déchets de solvants organiques ou de produits toxiques. L'EAE présente des avantages intéressants comme une efficacité catalytique élevée, une haute spécificité, des conditions de réactions douces et la préservation des activités biologiques des composés (Jeon *et al.*, 2011 ; Kadam *et al.*, 2013 ; Grosso *et al.*, 2015 ; Casas & Domínguez González, 2017 ; Pliego-Cortés *et al.*, 2020 ; Terme *et al.*, 2020).

L'extraction enzymatique des algues consiste à utiliser des enzymes pour améliorer l'extraction, majoritairement aqueuse, de composés sous leur forme native c'est-à-dire non dégradée. Les enzymes sont des protéines, impliquées dans toutes les voies métaboliques des cellules (cataboliques et anaboliques), dans lesquelles elles jouent un rôle majeur pour la biosynthèse et la dégradation des composés cellulaires. Les enzymes sont hautement spécifiques du substrat et des réactions qu'elles catalysent. Le comité de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire a permis la mise en place d'une nomenclature EC (Commission des Enzymes) pour la classification des enzymes en fonction des réactions catalysées. Les enzymes sont donc classées en sept principales familles : les **oxydoréductases** (EC 1), les **transférases** (EC 2), les **hydrolases** (EC 3), les **lyases** (EC 4), les **isomérases** (EC 5), les **ligases** (EC 6) et les **translocases** (EC 7). Chaque famille est ensuite divisée en sections en fonction de l'activité enzymatique (ex : EC 3.2.1.4: cellulase ; EC 3.2.1.81:  $\beta$ -agarase ; EC 3.4.21.62 : protéase, etc.) (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2021).

Dans l'EAE, les enzymes perturbent l'environnement moléculaire de l'algue comme la paroi cellulaire et membrane cellulaire par exemple. Les enzymes clivent les composés secondaires et visent à améliorer l'extraction de molécules cibles (Hardouin *et al.*, 2014a ; Michalak & Chojnacka, 2014). L'EAE appliquée à la biomasse algale consiste donc majoritairement en l'utilisation d'enzymes génériques, non ciblées sur leur substrat, pour aider et améliorer l'extraction des composés d'intérêts. Pour résumer, l'EAE utilise des enzymes dégradant la paroi algale en employant l'eau comme solvant d'extraction (Kim & Chojnacka, 2015).

Actuellement, la plupart des procédés d'EAE appliqués aux algues impliquent des préparations enzymatiques commerciales détournées de leurs domaines d'application d'origine comme la boulangerie, l'industrie de la bière ou encore des produits laitiers. Les substrats de ces enzymes sont rarement structurellement identiques à ceux présents dans les algues, ce qui diminue leur efficacité.

Malgré l'utilisation grandissante de l'EAE au cours des 30 dernières années, peu d'études ont porté sur l'utilisation de l'EAE pour l'extraction des ulvanes (Tableau IV). Les enzymes utilisées pour l'extraction des ulvanes sont des protéases et des carbohydrases (cellulases, xylanases et glucanases). L'étude d'Hardouin *et al.* (2014b) a permis d'évaluer la capacité de six préparations enzymatiques commerciales (protéases et carbohydrases) à solubiliser l'algue verte *Ulva armoricana* en phase aqueuse. Dans cette étude, les protéases ont significativement augmenté les rendements d'extraction aqueuse en comparaison avec le contrôle sans enzyme. La composition chimique des extraits solubilisés était significativement différente en fonction de l'enzyme utilisée, attestant ainsi de sa sélectivité. Les résultats suggèrent que les protéases permettent une meilleure solubilisation des sucres neutres ( $\beta$ -glucanes) et matriciels (ulvanes). L'EAE en utilisant la **protéase Protamex®** apparaît comme une technique prometteuse pour le recouvrement des ulvanes à partir d'*Ulva* sp. (Hardouin *et al.*, 2014b).

**Tableau IV : Extraction des ulvanes par EAE**

Enzymes	Algue	Solvant d'extraction	Références
<b>Cellulase + Protéase</b>	<i>Ulva</i> spp.	H <sub>2</sub> O + 1M HCl	(Lahaye & Axelos, 1993)
<b>Carbohydrases mix (Viscozyme)</b>			
<b>Xylanase/Glucanase</b>			
<b>Glucanase</b>	<i>Ulva armoricana</i>	H <sub>2</sub> O	(Hardouin <i>et al.</i> , 2014b, 2016)
<b>Cellulase</b>			
<b>Protéase neutre</b>			
<b>Mix de protéases neutre et alcaline</b>			
<b>Carbohydrases mix (Viscozyme)</b>	<i>Ulva fasciata</i> Delile	NaCH <sub>3</sub> COO	(Trivedi <i>et al.</i> , 2013)
<b>Cellulases (22128, 22119, 22086)</b>			
<b>Cellulase (Celluclast) puis Protéase (P-1236)</b>	<i>Ulva lactuca</i>	H <sub>2</sub> O + 1M HCl	(Yaich <i>et al.</i> , 2014)
<b>Protéase (Papaine)</b>	<i>Ulva lactuca</i>	NaCH <sub>3</sub> COO + EDTA	(de Araújo <i>et al.</i> , 2016)

L'emploi de l'EAE sur *Ulva* sp. pour l'extraction directe de composés hydrosolubles dont les ulvanes reste encore marginale. En effet, l'utilisation d'enzymes se fait couramment en traitement pré ou post-extraction des ulvanes pour leur purification. Les principales enzymes utilisées sont des amylases ou amyloglucosidases afin d'éliminer l'amidon, et des protéases afin d'éliminer les protéines (Lahaye & Jegou, 1993 ; Lahaye & Ray, 1995 ; Lahaye *et al.*, 1998, 1999 ; Paradossi *et al.*, 1999 ; Robic *et al.*, 2009c ; Alves *et al.*, 2013a ; Barros *et al.*, 2013 ; Xu *et al.*, 2015 ; Pankiewicz *et al.*, 2016).

### c) Purification des ulvanes

La purification des ulvanes correspond à la séparation des ulvanes d'autres molécules (ex : sels, protéines, etc.). La précipitation éthanolique pour le recouvrement d'ulvanes conduit en effet à des niveaux de sels élevés dans les fractions.



Pour cela, une **élimination des sels** peut être réalisée par **dialyse**, **ultrafiltration** ou encore **chromatographie**. La dialyse est une méthode très efficace pour l'élimination des sels et utilise des membranes dont le seuil de rétention est compris généralement entre 3,6 et 12 kDa.

L'élimination des protéines peut se faire par des méthodes chimiques, enzymatiques ou chromatographiques (Alves *et al.*, 2013b ; Tian *et al.*, 2015). La chromatographie comme la SEC (« Size-Exclusion Chromatography ») peut également être utilisée pour fractionner les oligosaccharides et les polysaccharides afin de déterminer la structure et générer des fractions de PM (poids moléculaires) différents pour l'étude des relations structure-fonction (Kidgell *et al.*, 2019).

### d) Procédés de dépolymérisation des ulvanes

Les bioactivités des poly- et oligosaccharides sulfatés algaux comme les ulvanes sont étroitement corrélées à leurs propriétés moléculaires, telles que leur Degré de Polymérisation (DP), leur poids moléculaire (PM), le type et le rapport des monosaccharides constitutifs, la configuration anomérique, la position des liaisons glycosidiques et leur contenu en sulfates (Qi *et al.*, 2005a, b ; Adrien *et al.*, 2017a ; Rostami *et al.*, 2017 ; Li *et al.*, 2018 ; Kidgell *et al.*, 2019). La dépolymérisation de ces polymères vise principalement à l'évaluation structurale et/ou l'amélioration de leur(s) activité(s) biologique(s). La dépolymérisation modifie le PM des ulvanes et leur contenu en sulfates (Kidgell *et al.*, 2019). La dépolymérisation des ulvanes peut être effectuée par différents procédés d'hydrolyse comme l'**hydrolyse enzymatique** et l'**hydrolyse chimique**.

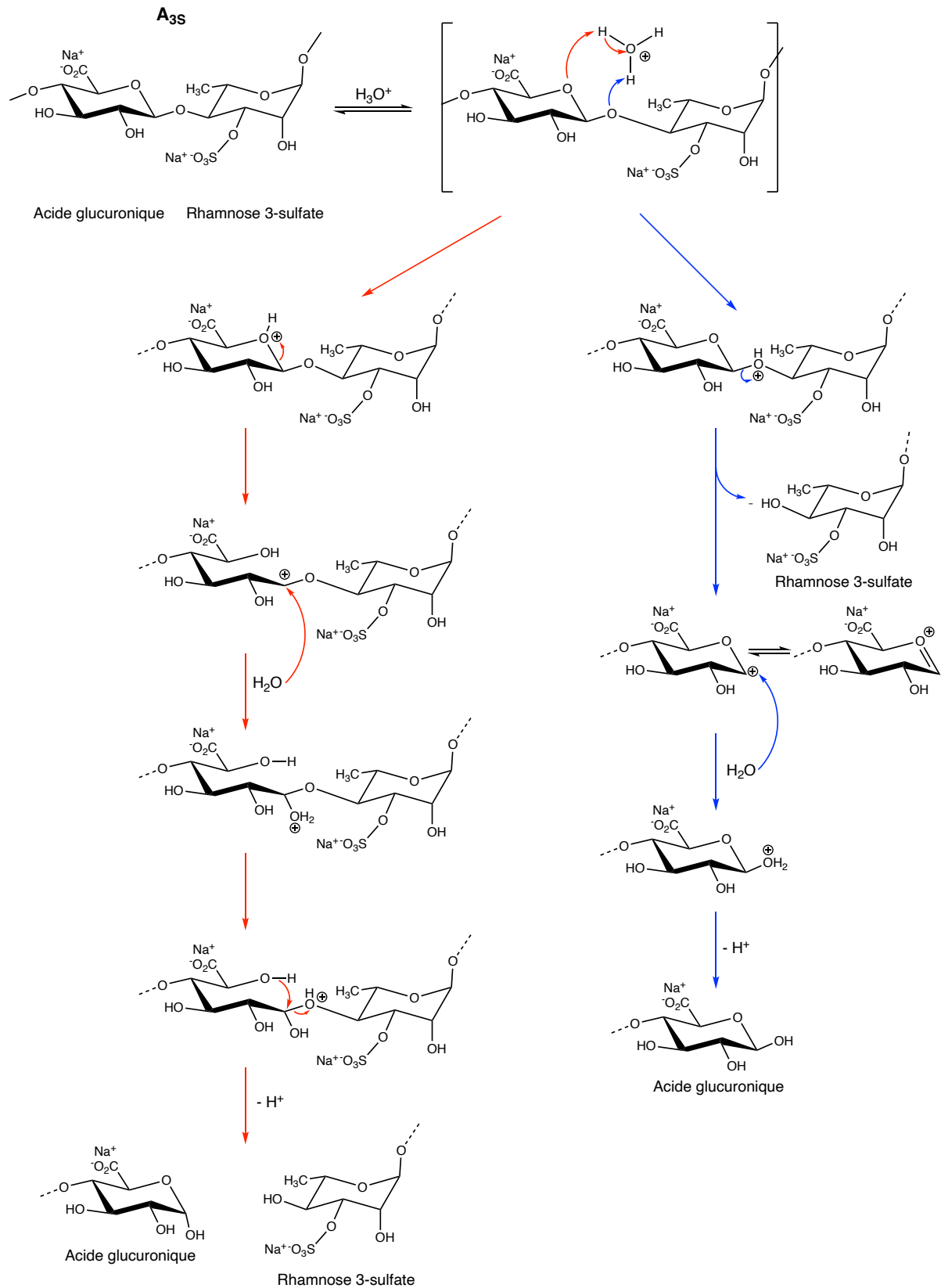
L'hydrolyse enzymatique consiste au clivage des composés d'intérêt par des enzymes spécifiques dédiées. Cette hydrolyse enzymatique permet la production de composés de bas PM avec d'éventuelles modifications moléculaires et vise principalement à produire des oligosaccharides spécifiques à partir d'ulvanes bruts (Coste *et al.*, 2015 ; Gurpilhares *et al.*, 2016 ; Fernández-Díaz *et al.*, 2017). Les ulvanes lyases permettent de dégrader les ulvanes en oligosaccharides uroniques (Lahaye *et al.*, 1997). Elles sont principalement isolées de bactéries marines ou de l'intestin d'animaux marins. Elles sont regroupées en 5 familles : PL24, PL25, PL28, PL37 et PL40 (Li *et al.*, 2020). Une ulvane lyase, isolée de bactérie à Gram-négatif de boues contenant des ulves en décomposition, permet par exemple de cliver le lien (1,4) entre le rhamnose-3-sulfate et l'acide glucuronique aboutissant à la libération d'oligosaccharides porteur d'un résidu insaturé d'acide uronique (Lahaye *et al.*, 1997).

L'hydrolyse chimique regroupe l'**hydrolyse acide** qui utilise soit directement un acide en solution (Quemener *et al.*, 1997 ; Kalsson & Singh, 1999) soit une résine acide (Lahaye *et al.*, 1998 ; Adrien *et al.*, 2017b), et l'**hydrolyse radicalaire** qui utilise le peroxyde d'hydrogène (Pengzhan *et al.*, 2004 ; Qi *et al.*, 2005a).

#### i. Dépolymérisation acide

La dépolymérisation acide se fait *via* la formation d'un intermédiaire à 6 centres comprenant un ion oxonium ( $H_3O^+$ ), l'atome d'oxygène intracyclique d'un monosaccharide et l'atome d'oxygène impliqué dans la liaison glycosidique (Figure 18) (Kayser *et al.*, 2013). Cette méthode induit couramment des désulfatations.

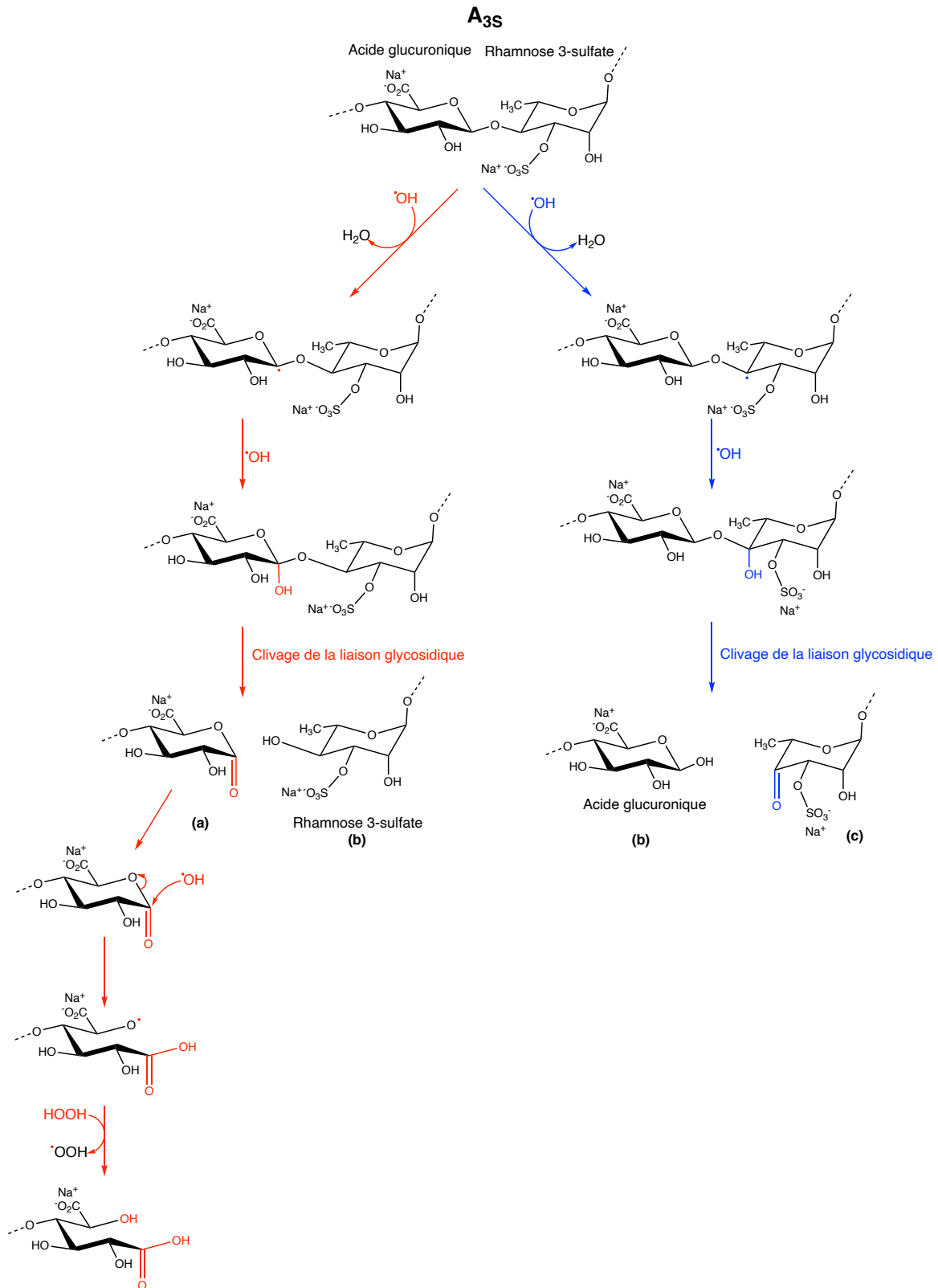




**Figure 18 : Mécanismes de dépolymérisation des ulvanes par voie chimique d'hydrolyse acide : exemple de l'acide ulvanobiuronique-3-sulfate type A (A<sub>3S</sub>)**  
 Modifié d'après Kayser *et al.* (2013).

ii. Dépolymérisation radicalaire

La dépolymérisation radicalaire consiste en l'action de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui va créer, en se dissociant, deux radicaux  $OH^\bullet$  capables d'attaquer les liaisons glycosidiques (Figure 19).



**Figure 19 : Mécanismes de dépolymérisation des ulvanes par voie chimique d'hydrolyse radicalaire : exemple de l'acide ulvanobiuronique-3-sulfate type A (A<sub>3S</sub>)**  
 Extrémités réductrices avec (a) groupement lactone et (c) groupement pyranone ; Extrémités non réductrices avec (b) groupement glucopyranose. Modifié d'après Soukaina *et al.* (2020).

Les travaux de Qi *et al.* (2005a) ont confirmé que la dépolymérisation radicalaire faisant intervenir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aboutissait au clivage de la liaison glycosidique sans affecter la structure chimique de base des ulvanes. L'avantage du peroxyde d'hydrogène est qu'il se décompose en produits non toxiques lors de sa dégradation (H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>). Aucun mécanisme détaillé n'est présent dans la littérature et celui-ci semble assez aléatoire (Delattre *et al.*, 2005).

Le mécanisme, proposé sur la Figure 19, est réalisé par transposition du mécanisme hypothétique des alginates aux ulvanes en raison de la présence de la liaison  $\beta$ -(1,4) dans les deux polysaccharides. Il est suggéré que l'attaque du radical permet la soustraction d'un atome d'hydrogène en position C1, C4 des polysaccharides liés en  $\beta$ -(1,4) et générerait un radical centré sur le carbone. Les radicaux au niveau des carbones engagés dans les liaisons glycosidiques subiraient une réaction de  $\beta$ -scission provoquant la rupture de la liaison glycosidique. Ceci entraînerait ensuite la formation de groupes carbonyles par réduction de l'extrémité C-4 (Figure 19(c)) et de groupes lactones par réduction de l'extrémité C-1 (Figure 19(a)) (Duan & Kasper, 2011 ; Soukaina *et al.*, 2020). De plus, comme le système réactionnel contient l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en excès, le groupe carbonyle du groupement lactone de l'extrémité réductrice généré (Figure 19(a)) peut ensuite être oxydé en groupe carboxyle (Soukaina *et al.*, 2020).

### C. Les polysaccharides algaux : composés bioactifs

---

Les macroalgues marines constituent la source la plus riche en composés biologiques, d'origine non animale, trouvée dans la nature (Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016). Le marché de ces macroalgues s'étend ainsi sur plusieurs industries comme l'agro-alimentaire, la nutrition animale, la chimie verte, les biocarburants mais également dans la santé et le bien-être avec la cosmétique, la nutraceutique et la pharmaceutique (Nayar & Bott, 2014 ; FAO, 2018 ; Hentati *et al.*, 2020).

Ces macroalgues sont en effet composées de diverses macromolécules biologiquement actives (polyphénols, diterpènes, AGPI, caroténoïdes, vitamines, phlorotanins, protéines, peptides et polysaccharides) avec des propriétés structurales et physico-chimiques différentes et des caractéristiques fonctionnelles intéressantes.

Les polysaccharides algaux pouvant être sulfatés (polysaccharides riches en fucose, carraghénanes, galactanes, agars et ulvanes) ou non sulfatés (alginate, laminarine), de PM élevé ou non, ont des structures et des compositions monosaccharidiques variées et présentent ainsi des activités biologiques diverses (Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016 ; Ul-Haq *et al.*, 2019 ; Hentati *et al.*, 2020).

De nombreuses recherches récentes décrivent des activités biologiques intéressantes de polysaccharides algaux natifs mais également de leurs dérivés comprenant les oligosaccharides et polysaccharides (bio)chimiquement modifiés.

## 1. Activités biologiques des ulvanes sur la santé humaine : relation structure/fonction

Parmi les activités biologiques des ulvanes les plus explorées sur la santé humaine, l'**activité antioxydante/antiradicalaire** (Hardouin *et al.*, 2016 ; Rahimi *et al.*, 2016 ; Le *et al.*, 2019), **antihyperlipidémique** (Pengzhan *et al.*, 2003 ; Qi *et al.*, 2012 ; Qi & Sheng, 2015), **anti-inflammatoire/immunomodulateur** (Peasura *et al.*, 2016 ; Matloub *et al.*, 2016 ; Berri *et al.*, 2017), **anticoagulante** (Qi *et al.*, 2013 ; Thi *et al.*, 2016 ; Thanh *et al.*, 2016), **anticancer/antitumorale** (Thanh *et al.*, 2016 ; Matloub *et al.*, 2018 ; Guidara *et al.*, 2021), **antibactérienne** (Tran *et al.*, 2018), **antivirale** (Aguilar-Briseño *et al.*, 2015 ; Morán-Santibañez *et al.*, 2016 ; Hardouin *et al.*, 2016), et d'**ingénierie tissulaire** (Alves *et al.*, 2010, 2013a ; Barros *et al.*, 2013) sont largement mentionnées.

Les capacités biologiques des polysaccharides algaux, y compris des ulvanes, dépendent de leurs caractéristiques structurales, de leur composition en monosaccharides, de leur poids moléculaire (PM), du type de liaisons *O*-glycosidiques (le long du squelette ou ramification) mais également de la teneur en sulfates et leur position, et de la stéréochimie. On parle alors de relation structure/fonction biologique. Certaines activités biologiques des ulvanes sur la santé sont présentées de manière non exhaustive en mettant en évidence les relations structure/fonction mettant principalement en jeu le **degré de sulfatation** et le **poids moléculaire** de ces molécules.

Des ulvanes de bas PM d'*U. pertusa* présentent une capacité antioxydante plus élevée que ceux de PM plus élevés (Qi *et al.*, 2005a). Toutefois, cette corrélation entre un bas PM et une meilleure activité antioxydante n'est pas une tendance générale puisque Yaich *et al.* (2017) ont montré que les ulvanes de plus haut PM d'*U. lactuca* présentent la plus forte activité antiradicalaire. Pengzhan *et al.* (2003) ont montré *in vivo* que des ulvanes de haut (152 kDa) et bas PM (28 kDa) issus d'*U. pertusa* ont des effets inverses sur le métabolisme des lipides. Ainsi, l'évaluation de l'effet du PM sur cette activité antihyperlipidémique semble mettre en évidence que plusieurs mécanismes fonctionnent en parallèle. Dans une autre étude, les ulvanes de plus haut PM (1450 et 1690 kDa) d'*U. pertusa* aboutissent à une activité immunomodulatoire deux fois plus élevée que ceux de plus bas PM (365 kDa) (Tabarsa *et al.*, 2012). Récemment, Kidgell *et al.* (2020) ont aussi montré que des ulvanes de hauts PM (21 et 209 kDa) d'*U. ohnoi* ont une meilleure activité anti-inflammatoire que ceux de plus bas PM. Néanmoins, Tabarsa *et al.* (2018) ont aussi montré que des ulvanes de plus bas PM (29 kDa) d'*U. intestinalis* sont davantage immunostimulants que ceux de plus haut PM (87 et 194 kDa).

Bien que le poids moléculaire semble être le facteur principal affectant l'activité des ulvanes, le degré de sulfatation est aussi un facteur déterminant. En effet, une désulfatation des ulvanes d'*U. rigida* entraîne une réduction d'environ 50% de l'effet immunomodulatoire (Leiro *et al.*, 2007). *In vitro*, il a été démontré que des ulvanes sur-sulfaté (x2) issus d'*Ulva pertusa* et d'*U. linza* présentent une activité antiradicalaire plus élevée que celle de l'ulvane natif (Qi *et al.*, 2005b ; Zhang *et al.*, 2011). À nouveau, un haut degré de sulfatation des ulvanes améliorerait l'activité antihyperlipidémique (Qi *et al.*, 2012 ; Qi & Sheng, 2015). D'autres travaux ont également mis en évidence que le procédé de sulfatation chimique d'ulvanes entraîne une augmentation de l'activité anticoagulante (Adrien *et al.*, 2019).

D'autres travaux montrent qu'une meilleure bioactivité des ulvanes serait corrélée à un couplage de la teneur en sulfates et du poids moléculaire (haut ou bas PM). En effet, les travaux de Lopes *et al.* (2017a) sur des cellules carcinome épithélial du larynx humain infectées par le virus de l'herpès simplex ont montré que l'ulvane hautement sulfatée (x3,6) d'*U. compressa* a une meilleure activité antivirale comparé à l'ulvane natif. Aussi, dans cette étude, l'ulvane hautement sulfatée de plus haut PM (34 kDa) présente une activité antivirale de 2 à 5 fois plus élevée que l'ulvane de bas PM (< 5 kDa). D'autres travaux montrent qu'un ulvane hydrolysé (11 kDa) augmente l'activité anticoagulante en comparaison avec un ulvan natif (108 kDa), et qu'une sur-sulfatation (x1,7) de l'ulvane hydrolysé conduit à une augmentation supplémentaire de l'activité (Wang *et al.*, 2013). Cui *et al.* (2018) ont montré que l'augmentation de la sulfatation conduisait à une augmentation de l'activité anticoagulante jusqu'à ce qu'un seuil de PM soit atteint (< 200 kDa) et à partir duquel une perte d'activité complète a lieu.

À travers l'étude de ces différentes bioactivités, il apparaît que plus le degré de sulfatation des ulvanes est élevé, meilleure est l'activité biologique sur la santé humaine. Néanmoins, lorsque l'on considère le poids moléculaire des ulvanes, cette conclusion n'est pas toujours vérifiée puisque selon les études, les résultats peuvent être contradictoires. Les différentes études concluent également à des corrélations structure-activité qui seraient spécifiques à l'espèce d'algue dont les ulvanes sont issues.

## 2. Activités biologiques de polysaccharides algaux sur le système cutané : applications en dermo-cosmétique

Un **cosmétique** est défini par le Règlement Européen 1223/2009 comme « toute substance ou tout 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 » (Parlement Européen et du Conseil, 2009).

L'industrie cosmétique est un secteur industriel clé en Europe avec un marché évalué en 2018 à 78,6 milliards d'euros. Après l'Allemagne, la France a le plus grand marché de produits cosmétiques (11,4 milliards d'euros) (Cosmetics Europe, 2019).

Cette industrie est toujours à la recherche de nouveaux ingrédients, soit pour de nouvelles objectivations scientifiques et marketing d'un produit, soit pour remplacer les ingrédients interdits ou qui font l'objet de la méfiance des consommateurs (Couteau & Coiffard, 2016). La demande croissante en **cosmétique « naturelle »** basée sur des ingrédients fonctionnels et actifs d'**origine naturelle, durables**, conçus de manière **éthique et écoresponsable**, permet de valoriser les molécules d'origine marine dans un secteur à haute valeur ajoutée (Pimentel *et al.*, 2017 ; Brunt & Burgess, 2018 ; Pereira, 2018 ; Lourenço-Lopes *et al.*, 2020).

Les algues, en raison de leur richesse et leur diversité, constituent un réservoir potentiel de substances bioactives pouvant être utilisés comme ingrédients fonctionnels et actifs pour des applications cosmétiques, on parle alors de **phycocosmétique** (Couteau & Coiffard, 2016). L'intérêt de l'utilisation des algues en cosmétique est croissant avec plus de 8500 documents publiés dont 45,2% d'articles de recherche, 23,1% de livres et chapitres, et 17,6% de revues scientifiques.

En région Bretagne, de nombreuses sociétés s'intéressent à leur valorisation en cosmétique comme Algotharm, Phytomer, Codif International, Sciences et Mer, BiotechMarine ou encore Aleor (Couteau & Coiffard, 2016). Le concept d'**économie circulaire** faisant également son apparition dans le secteur cosmétique, la valorisation de macroalgues invasives/prolifératives pourrait être davantage considérée en cosmétique (Lourenço-Lopes *et al.*, 2020).

Les composés de macroalgues les plus fréquemment retrouvés dans la liste INCI (« International Nomenclature of Cosmetic Ingredients ») de produits cosmétiques en tant qu'ingrédients fonctionnels/excipients ou additifs sont les polysaccharides pariétaux comme les agars, les carraghénanes et les alginates avec des rôles d'agents gélifiants, épaississants, émulsifiants ou stabilisateurs d'émulsions (Wang *et al.*, 2015 ; Couteau & Coiffard, 2016 ; Pimentel *et al.*, 2017 ; Pereira, 2018). Par ailleurs, les nombreux métabolites algaux primaires (polysaccharides, protéines, acides aminés, lipides, acides gras et vitamines) et secondaires (pigments, composés phénoliques, stérols, vitamines, etc.), sont utilisés pour plusieurs de leurs applications biologiques en cosmétique comme l'hydratation, l'anti-photovieillessement, l'antioxydation, l'anti-pigmentation, l'anti-vieillessement, l'anti-inflammatoire, l'amincissant ou l'antimicrobien. Ces différentes activités cosmétiques et les composés algaux associés sont présentés dans le Tableau V (Couteau & Coiffard, 2016, 2020 ; Guillaume *et al.*, 2017 ; Brunt & Burgess, 2018 ; Pereira, 2018 ; Jesumani *et al.*, 2019a ; Michalak *et al.*, 2020 ; Lourenço-Lopes *et al.*, 2020).

**Tableau V : Composés bioactifs algaux et leurs fonctions en cosmétique**

Fonction	Composés biologiques actifs
<b>Hydratation</b>	Lipides, Acides Gras PolyInsaturés (AGPI), Acides aminés (NMF, « Natural Moisturizing Factors »), Polysaccharides, Oligosaccharides, Caroténoïdes
<b>Anti-photovieillessement</b> <b>Antioxydation</b>	Mycosporine-like Amino Acids (MAA), AGPI, Caroténoïdes, Composés polyphénoliques, Pigments, Polysaccharides, Peptides
<b>Anti-pigmentation</b>	Composés phénoliques, Phlorotanins, Flavonoïdes, Polysaccharides, Acides aminés
<b>Anti-vieillessement</b>	Acides aminés, Phlorotanins, Caroténoïdes, MAA, Peptides, Polysaccharides, Lipides
<b>Anti-inflammatoire</b>	Polysaccharides sulfatés, Protéines, Lipides, Composés phénoliques, Phlorotanins
<b>Amincissant</b>	Iode, Flavonoïdes, Phlorotanins
<b>Antimicrobienne</b>	Alcaloïdes, Flavonoïdes, Composés phénoliques, Polysaccharides, Protéines
<b>Coloration</b>	Pigments, Caroténoïdes

Les **poly-** et **oligosaccharides** de macroalgues sont étudiés pour leurs potentielles activités biologiques en cosmétique, notamment des activités **photoprotectrice**, **anti-vieillessement**, de  **cicatrisation cutanée/régénération tissulaire** et sur le **microbiote cutané** (anti- ou pro-microbien).

Les activités de ces polysaccharides algaux, démontrées dans un cadre conforme à la réglementation européenne cosmétique des tests d'évaluation, notamment sur des composants du système cutané et microbiote cutané sont détaillées dans le Tableau VI (p. 74).

On constate qu'à l'heure actuelle, la majorité des études portant sur le système cutané concerne les effets de polysaccharides issus d'algues brunes, et les données de littérature concernant ceux issus d'algues rouges et vertes sont encore limitées.

### a) Activité anti-vieillessement

Le vieillissement cutané intrinsèque et extrinsèque (ex : photovieillessement) se caractérisent par des modifications de l'épiderme et du derme, notamment des fibroblastes et composants de la Matrice ExtraCellulaire (MEC) comme les fibres élastiques, collagènes de type I et III, GlycosAminoGlycanes (GAG) et ProtéoGlycanes (PG), MétalloProtéinases Matricielles (MMP) et leurs inhibiteurs (TIMP, « Tissue Inhibitor of MetalloProteases »). Ce vieillissement fait suite à des mécanismes moléculaires comme le stress oxydatif, l'action de cytokines inflammatoires, une altération de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) et le raccourcissement des télomères. Les principales activités anti-vieillessement objectivées sont donc une activité antioxydante, une activité anti-photovieillessement et une activité de rééquilibrage des composants de la MEC.

#### i. Activité antioxydante

Le stress oxydatif est causé par un déséquilibre entre la production et la neutralisation des radicaux libres comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS, « Reactive Oxygen Species ») et les espèces réactives de l'azote qui attaquent les biomolécules comme les lipides, l'ADN, les protéines et les sucres. Ainsi, le stress oxydatif est impliqué dans différents troubles tels que les maladies inflammatoires, neurodégénératives, cardiovasculaires, le cancer et le processus de vieillissement (Pizzino *et al.*, 2017). Dans le cadre du vieillissement cutané, les ROS aboutissent aussi indirectement à la production de MMP *via* la voie des MAPK (« Mitogen-Activated Protein Kinases »). Les études de bioactivités de polysaccharides algaux sur des cellules du système cutané soumises à l'induction de ROS par le peroxyde d'hydrogène, *in vitro*, sont relativement peu nombreuses mais démontrent une activité antioxydante et de limitation du stress oxydatif (Cai *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2019 ; Ozanne *et al.*, 2020).

#### ii. Activité anti-photovieillessement

Les rayons UltraVioletes (UV) produisent également des ROS et causent des dommages cutanés sous le nom de « stress photo-oxydatif » (Fernando *et al.*, 2018a). Ainsi, l'évaluation de l'activité anti-photovieillessement est d'un grand intérêt dans le secteur cosmétique de l'anti-vieillessement. Les polysaccharides sulfatés riches en fucose des algues brunes *F. vesiculosus*, *S. longicuris*, *S. glaucescens*, *S. fusiforme*, *S. hemiphylum* et *S. confusum* ont la capacité à :

- Améliorer la viabilité cellulaire de kératinocytes ou fibroblastes humains exposés aux UVB (Moon *et al.*, 2009 ; Hwang *et al.*, 2017 ; Wang *et al.*, 2018 ; Fernando *et al.*, 2020) ou UVA (Li *et al.*, 2019).

- Réguler les voies MAPK (avec le facteur de transcription AP-1, « Activator Protein-1) et NF- $\kappa$ B (« Nuclear Factor-kappa B ») de fibroblastes humains exposés aux UVB (Moon *et al.*, 2009 ; Hwang *et al.*, 2017 ; Wang *et al.*, 2018 ; Fernando *et al.*, 2020).
- Réduire la production de MMP et d'augmenter la production de collagène de type I de fibroblastes exposés aux UVB (Moon *et al.*, 2009 ; Hwang *et al.*, 2017 ; Wang *et al.*, 2018).

### iii. Activité de promotion de la synthèse de constituants de la MEC et d'inhibition des MMP

La stimulation de la synthèse de collagène et de GAG, ainsi que l'inhibition des MMP sont des mécanismes fréquemment objectivés dans l'activité anti-vieillesse (Couteau & Coiffard, 2016).

Des évaluations *in vitro* sur des collagénases et élastases commerciales ont mises en évidence l'activité inhibitrice de polysaccharides sulfatés algaux riche en fucose des algues *F. vesiculosus*, *S. fusiforme* et *C. minima* (Fitton *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2018 ; Fernando *et al.*, 2018b).

*In vitro*, les polysaccharides sulfatés algaux (polysaccharides sulfatés riches en fucose, galactofucanes et ulvanes) peuvent stimuler la prolifération des fibroblastes dermiques humains (Senni *et al.*, 1998 ; Yvin *et al.*, 1999 ; Ko *et al.*, 2013), augmenter la production de collagène de type I (Rioux *et al.*, 2013 ; Ko *et al.*, 2013) ou d'acide hyaluronique (Adrien *et al.*, 2017b), et diminuer la synthèse et l'activité de MMP et d'élastase (Senni *et al.*, 2006 ; Ko *et al.*, 2013).

### b) Activité de cicatrisation cutanée/régénération tissulaire

Les polysaccharides algaux susceptibles d'augmenter la production de collagène de type I, impliqué la néosynthèse du derme, et d'augmenter la production et l'activité de MMP pour l'élimination des débris cellulaires sont d'un grand intérêt dans le cadre de la cicatrisation cutanée.

Une étude a montré l'efficacité de la laminarine issue de *S. longicuris* sur l'augmentation de l'épaisseur d'un derme reconstruit, sur l'augmentation de la synthèse de collagène de type I et de l'activité de MMP sur des fibroblastes en culture et sur le derme reconstruit (Ayoub *et al.*, 2015). Un galactane sulfaté de l'algue rouge *Gracilaria lemaneiformis* a démontré une activité de promotion de la cicatrisation cutanée sur des kératinocytes blessés *via* la promotion de la prolifération, la migration et la polarisation cellulaire par l'activation de voie de signalisation PI3K/apKC (« Phosphatidylnositol 3-Kinase/atypical protein Kinase C ») (Veeraperumal *et al.*, 2020).

### c) Activité sur le microbiote cutané

L'industrie cosmétique a identifié le potentiel du microbiote cutané, impliqué dans l'homéostasie cutanée, avec de plus en plus d'études menées sur la recherche d'ingrédients actifs ciblant ce microbiote cutané. En effet, les entreprises dermo-cosmétiques doivent désormais se soumettre à des études sur le microbiote cutané lors du développement de nouveaux ingrédients ou produits finaux afin de garantir aux consommateurs que leurs produits maintiennent, améliorent un microbiote sain ou rétablissent un équilibre peau-microbiote sain en cas de microbiote perturbé (Shokryazdan *et al.*, 2014 ; Lopes *et al.*, 2017b ; Khmaladze *et al.*, 2019).



En 2019, la première certification « Microbiome-friendly » mise en place par « MyMicrobiome » est apparue pour le produit cosmétique final afin de garantir que le produit est exempt de toute contamination, que les bactéries spécifiques de la zone ciblée seront indemnes, que la diversité du microbiome est préservée et que l'équilibre cutané n'est pas perturbé par la suppression de bactéries commensales ou la stimulation de bactéries pathogènes.

Les ingrédients actifs cosmétiques ciblent particulièrement les espèces bactériennes *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Cutibacterium acnes*. Ces bactéries ont des rôles fondamentaux au sein du microbiote cutané, qui sont présentés dans la suite du manuscrit.

Ainsi, les effets biologiques couramment évalués sur ces bactéries sont (Hillion, 2013 ; Dréno *et al.*, 2016 ; Percoco, 2018) :

- La promotion du métabolisme commensal (croissance bactérienne et/ou sécrétion de métabolites d'intérêt) et/ou promotion de la diversité bactérienne avec le rapport *S. epidermidis*/*C. acnes* pour limiter l'invasion de bactéries pathogènes.
- La réduction de la croissance, de la virulence et du biofilm des pathogènes. En effet, les biofilms, les facteurs de virulence et le quorum sensing de *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes* apparaissent comme des cibles intéressantes à des fins cosmétiques puisque ces bactéries sous forme pathogène sont impliquées dans des pathogénèses cutanées courantes comme l'acné et la dermatite atopique.
- La modulation du microenvironnement cutané et la modulation des réponses immunitaires avec la réduction de l'inflammation cutanée *via* des médiateurs de stress de l'hôte, des cytokines ou des niveaux de MMP, puisque le lien cause-conséquence entre les pathologies cutanées et la dysbiose du microbiote n'est pas encore établi.

Ainsi, les actifs algaux peuvent être classés en deux catégories selon leur utilisation par le microorganisme :

- Des ingrédients actifs qui ne sont pas une source de nutriments.
- Des prébiotiques comme source de nutriments qui confèrent un bénéfice pour la santé avec modulation de la structure et de la fonctionnalité du microbiote hôte, en application topique pour le secteur cosmétique.

Les poly-et oligosaccharides sont souvent considérés comme des prébiotiques potentiels pour les bactéries commensales et donc pour l'intégrité du microbiote cutané (Sardari & Nordberg Karlsson, 2018). Toutefois, certaines études ont démontré des activités antibactériennes des polysaccharides algaux. En effet, les polysaccharides sulfatés de l'algue rouge *Corallina*, correspondant à des galactanes sulfatés et carraghénanes ont démontrées des activités antibactériennes contre *S. epidermidis* (CIP, Collection Institut Pasteur, 444) (Sebaaly *et al.*, 2014). L'activité antibactérienne des polysaccharides serait principalement due à la présence de récepteurs de glycoprotéines à la surface des bactéries et qui, après liaison, réagissent avec des composés de la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique bactérienne. Ceci perturbe la perméabilité de la membrane bactérienne *via* l'augmentation du stress oxydatif et engendre la fuite de protéines et des dommages à l'ADN bactérien

(Palanisamy *et al.*, 2019). Par ailleurs, la formation du biofilm de *S. epidermidis* (ATCC-35984, « American Type Culture Collection ») peut être inhibé par les hétérofucanes de *Sargassum filipendula* via la distribution de charges négatives des polysaccharides qui affecteraient l'adhésion bactérienne par répulsion électrostatique (Telles *et al.*, 2018).

Néanmoins, d'autres polysaccharides algaux n'ont pas cet effet antibactérien contre *S. epidermidis* et au contraire ont la capacité à rétablir l'équilibre du microbiote.

C'est le cas de l'actif ExpoZen® de l'entreprise GREENTECH, extrait d'*Halymenia durvillei*, enrichi en polysaccharides de bas poids moléculaire, qui augmente la diversité bactérienne et le niveau de *S. epidermidis* après 28 jours de traitements sur des échantillons issus de 30 volontaires aux peaux réactives et sensibles (Filaire *et al.*, 2019a). D'autres polysaccharides algaux comme ceux issus l'algue *Gracilaria* sp. (Assaw *et al.*, 2018), d'*U. reticulata* (Tran *et al.*, 2018) ou de *S. vachellianum* (Jesumani *et al.*, 2020) n'ont aucune capacité antibactérienne sur les souches de staphylocoques comme *S. epidermidis* et/ou *S. aureus*.

### **d) Relation structure/fonction des polysaccharides algaux sur le système cutané**

De la même manière que pour les autres activités biologiques présentées précédemment, les activités biologiques exercées par les polysaccharides algaux objectivées sur le système cutané humain, dépendent de leurs caractéristiques structurelles et biochimiques.

Rioux *et al.* (2013) ont démontré des différences d'activités métaboliques (prolifération cellulaire et synthèse de composants matriciels) des galactofucanes en fonction du poids moléculaire. Les galactofucanes bruts réduisent la prolifération cellulaire et augmentent la sécrétion de MMP tandis que les galactofucanes dépolymérisés augmentent significativement la sécrétion de collagène de type I et n'ont aucun impact sur la prolifération des fibroblastes. Les travaux d'Adrien *et al.* (2017b) sur des ulvanes bruts et dépolymérisés ont mis en évidence une meilleure activité anti-vieillessement des ulvanes de plus haut poids moléculaire via une meilleure production d'acide hyaluronique par les fibroblastes. Hwang *et al.* (2017) ont démontré une meilleure activité anti-photovieillessement de la fraction de bas poids moléculaire (0,8 kDa) et une perte de l'activité biologique avec la perte de sulfate. De la même façon, Fernando *et al.* (2020) ont montré une meilleure activité anti-photovieillessement de la fraction de plus faible poids moléculaire.

Ainsi, les polysaccharides constitutifs de la paroi des algues, dont les ulvanes de la paroi d'*Ulva* sp., présentent des activités biologiques démontré *in vitro* et *in vivo*. Toutefois, les études concernant les effets d'ulvanes sur le système cutané sont relativement peu nombreuses (Ko *et al.*, 2013 ; Cai *et al.*, 2016 ; Adrien *et al.*, 2017b). Aussi, afin de comprendre le fonctionnement de ces actifs biologiques ainsi que leur zone d'activité pour une application en dermo-cosmétique, il est indispensable de s'intéresser au système cutané, d'identifier et d'analyser les marqueurs d'intérêts cutanés.

Tableau VI : Activités biologiques potentielles cosmétiques de polysaccharides algaux

Macroalgue	Composé(s)	Modèle(s) d'étude(s) + Méthode(s) d'analyse(s)	Résultats d'activité(s) biologique(s)	Activité(s) cosmétique(s) potentielle(s)	Références	
Rhodophyceae	<i>Halymenia durvillei</i>	Polysaccharides de bas PM (< 5 kDa) riches en galactose (93%)	<b>In vivo</b> 25 femmes volontaires : Application 2 fois/j Séquençage ADN nouvelle génération (ARN 16S, région V1-V3) Concentration testée : 3% Durée d'exposition : 28 j	Maintien des phyla majeurs Diminution du niveau de <i>Corynebacterium kroppenstedtii</i> de 10% (bactérie associée à la rougeur cutanée et au vieillissement) Augmentation du niveau de <i>S. epidermidis</i> (12%)	Restauration du microbiote cutané	(Filaire <i>et al.</i> , 2019a)
	<i>Gracilaria fisheri</i>	Galactanes sulfatés	<b>In vitro</b> Fibroblastes dermiques humains	Aucun effet sur le taux de survie cellulaire Régulation de la production de collagène, élastine, acide hyaluronique, MMP-1 et TIMP-1	Anti-vieillesse	(Pratoomthai <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	GLP-2 : Polysaccharide sulfaté de 157 kDa composé d'une alternance d'unités 3,6-anhydro-α-L-galactopyranosyle et β-D-galactopyranosyle sulfatés	<b>In vitro</b> Kératinocytes HaCaT soumis à des blessures par pointes de micropipette Concentrations testées : 0 à 400 µg/ml Durées d'exposition : 4, 12, 24 et 48 h 1) Prolifération cellulaire par comptage et incorporation de l'EdU (5-éthyl-2-deoxyuridine) : observation au microscope confocal 2) Teneur en ADN des phases du cycle cellulaire évaluée par un kit « Cell cycle » (Beyotime) 3) Migration cellulaire dans chambre de Transwell 4) Polarisation cellulaire et migration cellulaire évaluées par l'orientation de Golgi et la formation de lamellipodes (actine tracker) 5 + 6) Expression protéique de Cdc-42, Rac-1, Par-3, aPKC, Akt, pAkt et GAPDH par Western Blot	Concentration active de GLP-2 : 100 µg/ml 1) Promotion de la prolifération cellulaire après 24 h et 48 h d'incubation ; promotion de la prolifération cellulaire dans la zone sans plaie et aux bords de la plaie à 24 h pendant la cicatrisation 2) Augmentation de la teneur en ADN de la phase S du cycle cellulaire pendant la cicatrisation 3) Promotion de migration cellulaire après 12 h et 24 h pendant la cicatrisation 4) Augmentation significative de la polarisation cellulaire, de la formation de lamellipode à 4 h pendant la cicatrisation 5) Augmentation de l'expression protéique de Cdc-42, Rac-1, Par-3 et aPKC à 24 h pendant la cicatrisation 6) Augmentation de la phosphorylation d'Akt à 24 h pendant la cicatrisation	Cicatrisation cutanée	(Veeraperumal <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Gracilaria</i> sp.	Polysaccharides : agar (42% de sucres totaux)	<b>In vitro</b> <i>S. epidermidis</i> et <i>S. aureus</i> Croissance bactérienne par méthode de diffusion par puits d'agar Concentrations testées : 0 à 25 mg/ml Durée d'exposition : 24 h	Aucune activité antibactérienne contre <i>S. epidermidis</i> et <i>S. aureus</i>	Maintien du microbiote cutané	(Assaw <i>et al.</i> , 2018)
Phaeophyceae	<i>Fucus vesiculosus</i>	Extrait FV : composé de 58,6% de polysaccharides sulfatés riches en fucose, 33,7% de polyphénols et 10,1% de sulfates	<b>In vitro</b> 1) Enzymes : élastase, collagénase Concentrations testées : 0 à 0,1 mg/ml 2) Test d'inhibition de la glycation Concentrations testées : 0,1 et 0,2 mg/ml 3) RHE irradiés aux UVB Concentrations testées : 30 et 100 µg/ml Durée d'exposition : 24 h	1) Inhibition de l'élastase : CE <sub>50</sub> =76 µg/ml en présence de FV ; CE <sub>50</sub> =68 µg/ml en présence d'UP Inhibition de la collagénase : CI <sub>50</sub> =60 µg/ml en présence de FV ; CI <sub>50</sub> =55 µg/ml en présence d'UP 2) Inhibition de 45% et 50% de la glycation en présence de FV et UP respectivement à 0,2 mg/ml	Anti-vieillesse	(Fitton <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Undaria pinnatifida</i>	Extrait UP : composé de 89,6% de polysaccharides sulfatés riches en fucose, < 2% de polyphénols et 27,4% de sulfates	3) Augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la cicatrisation en présence d'UP : immunité innée (TLR2/3), enzymes et protéines de la MEC (MMP-1, -3, -9, -14, et VEGFA)	Anti-photovieillesse Anti-inflammatoire		

## Chapitre 1 : Revue de la littérature

<i>Chnoospora minima</i> <i>Sargassum polycystum</i>	Polysaccharides sulfatés riches en fucose	<b>In vitro</b> Enzymes : élastase et collagénase commerciales <b>Concentrations testées</b> : 100, 200 et 400 µg/ml	Inhibition significative dose-dépendante des activités de collagénase et d'élastase	Anti-vieillessement	(Fernando <i>et al.</i> , 2018b)
	Galactofucanes bruts : M05 : 1529 kDa N05 : 638 kDa	<b>In vitro</b> <b>Fibroblastes dermiques humains issus de biopsies de peaux</b> <b>Concentrations testées</b> : 1, 2 et 4 mg/ml <b>Durée d'exposition</b> : 6 jours	1) Diminution significative de la prolifération cellulaire 2) Augmentation de l'apoptose après 24 h d'incubation 3) Réduction de la sécrétion de collagène de type I 4) Augmentation significative de l'activité catalytique de MMP en présence de M05 aux concentrations testées	Anti-vieillessement	(Rioux <i>et al.</i> , 2013)
	Galactofucanes obtenus par dépolymérisation radicalaire (PM < 10 kDa) : RDP M05 et RDP N05	1) Prolifération cellulaire par comptage 2) Apoptose par marquage à l'iodure de propidium 3) Synthèse procollagène type I C-peptide par kit ELISA 4) Activité MMP (-1, -2, -3, -7, -8, -9, -12, -13 et -14) par Sensolyte™ 520 Generic MMP assay kit (Anaspec)	1) Aucun effet sur la prolifération cellulaire en présence de RDP M05 et augmentation significative en présence de RDP N05 à 1 mg/ml 2) Aucun effet sur l'apoptose 3) Augmentation dose-dépendante de la sécrétion de collagène de type I 4) Aucun effet significatif sur l'activité de MMP		
<i>Saccharina longicuris</i>	Polysaccharides sulfatés riches en fucose	<b>In vitro</b> <b>Fibroblastes dermiques humains de prépuce (lignée cellulaire Hs68) irradiés aux UVB (100 mJ/cm<sup>2</sup>) après incubation avec les extraits</b> <b>Concentrations testées</b> avant irradiation aux UVB : 0, 1, 10, 25, 50 et 100 µg/ml <b>Durée d'exposition</b> : 24 h	1) Augmentation de la viabilité cellulaire après 24 h d'incubation aux concentrations de 10, 25 et 50 µg/ml 2) Inhibition dose-dépendante de l'expression protéique de MMP-1 aux concentrations de 1, 10, 25, 50 et 100 µg/ml 3) Inhibition dose-dépendante de l'expression au niveau transcriptomique de MMP-1 aux concentrations de 1, 10, 25, 50 et 100 µg/ml 4) Inhibition de l'activation de ERK 5) Diminution dose-dépendante de l'activité du promoteur de MMP-1 aux concentrations de 1, 10 et 100 µg/ml 6+7) Augmentation dose-dépendante du niveau d'expression d'ARNm et protéique de procollagène de type I aux concentrations de 1, 10 et 100 µg/ml	Anti-photovieillessement	(Moon <i>et al.</i> , 2008, 2009)
		1) Viabilité cellulaire par test MTT 2) Synthèse au niveau protéique de MMP-1 évaluée par Western Blot (WB) 3) Niveau d'expression de l'ARNm de MMP-1 par RT-qPCR 4) Synthèse protéique de ERK et JNK évaluée par WB 5) Activité du promoteur de MMP-1 par luminométrie 6+7) Niveaux d'expression de procollagène de type I au protéique par WB et transcriptomique par RT-qPCR			
	Laminarine (68,2% glucose et 1,2% mannitol) de 2,9 kDa	<b>In vitro</b> <b>Fibroblastes dermiques humains issus de volontaires âgées de 18 à 30 ans</b> <b>Concentrations testées</b> : 1,25, 2,5, 5, 10, 25 et 50 µg/ml <b>Durées d'exposition</b> : 7 jours pour monoculture de fibroblastes ou 35 jours pour derme reconstruit	1) Aucune modification de la prolifération cellulaire 2) Augmentation de l'épaisseur du derme reconstruit en présence de laminarine aux concentrations de 5 et 10 µg/ml 3) Augmentation du collagène de type I (x8,6) au niveau des fibroblastes et du derme reconstruit en présence de laminarine à la concentration de 10 µg/ml Aucune modification de l'expression d'α-SMA 4) Augmentation de l'activité de MMP en présence de laminarine à la concentration de 5 et 10 µg/ml	Cicatrisation cutanée	(Ayoub <i>et al.</i> , 2015)
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Fucane de 20 kDa (44% fucose, 7% acides uroniques et 28% groupements sulfates)	<b>In vitro</b> <b>Fibroblastes dermiques humains de trois patients âgés de 15 à 30 ans</b> <b>Concentrations testées</b> : 1, 10 et 100 µg/ml <b>Durées d'exposition</b> : 1 à 4 jours	1) Augmentation de la prolifération cellulaire temps-dépendante et activité maximale en présence de fucane à la concentration de 10 µg/ml (de +41 à +56% selon le temps d'incubation)	Anti-vieillessement	(Senni <i>et al.</i> , 1998)
		1) Prolifération cellulaire par comptage			

		<p>2) Synthèse de pro-MMP-2 par zymographie                  3) Biosynthèse des collagènes mesurée après incorporation de proline tritiée (<sup>3</sup>H-Pro)</p>	<p>2) Augmentation de la sécrétion de pro-MMP-2 (+119, +51 et +65% aux concentrations de 1, 10 et 100 µg/ml respectivement)                  3) Augmentation faible du % de collagènes de la couche cellulaire (intra + péricellulaire) Diminution du rapport synthèse collagénique globale/synthèse protéique globale</p>		
	<p>Fraction de 16 kDa de polysaccharides sulfatés riches en fucose (55,7% L-fucose, 6,3% acides uroniques, 29% groupements sulfates)</p>	<p><b>In vitro</b>  <b>Fibroblastes dermiques humains, issus de prépuce de sujets âgés de 3 et 4 ans, soumis ou non à un pré-traitement à l'IL-1β (90 min) ou une exposition continue d'IL-1β</b>  <b>Concentrations testées</b> : 10 et 100 µg/ml  <b>Durée d'exposition</b> : 48 h                  1) Activité gélatinolytique de MMP-2 par zymographie                  2) Expression protéique de MMP-2, -3 et TIMP-1 par WB et ELISA</p>	<p>1+2) Inhibition dose-dépendante de la sécrétion de la pro-MMP-2 avec sous sans exposition à l'IL-1β                  2) Diminution de l'induction de pro-MMP-3 par l'IL-1β (39 - 50%)                  Augmentation non significative du taux d'association de MMP-2 avec TIMP-1 avec ou sans exposition à l'IL-1β (x2 et x3 aux concentrations de 10 et 100 µg/ml respectivement)                  Augmentation significative de la formation de complexe avec TIMP-1</p>	Anti-vieillessement	(Senni <i>et al.</i> , 2006)
		<p><b>Ex vivo</b>  <b>Explants de peau soumis à l'élastase leucocytaire humaine (2 ou 5 µg)</b>  <b>Concentrations testées</b> : 1, 10 et 100 µg/ml  <b>Traitement ou pré-exposition avec les extraits</b>                  Fibres élastiques du derme par analyses histologiques et analyses d'images</p>	<p>Diminution dose-dépendante de la dégradation des fibres élastiques induite par l'élastase                  Jonction dermo-épidermique intacte                  Réseaux de fibres élastiques semblables au contrôle                  Protection de la dégradation des fibres élastiques induite par l'élastase par pré-exposition des explants aux extraits à 100 µg/ml</p>		
		<p><b>In vitro</b>                  Enzymes : élastase et collagénase commerciales  <b>Concentrations testées</b> : 50, 100 et 200 µg/ml</p>	<p>Inhibition dose-dépendante de la collagénase (13,5 à 49,8%) et de l'élastase (18,8% à 56,5%)</p>		
Sargassum fusiforme	<p>Extrait riche en polysaccharides sulfatés (63,6%) composés de fucose (53,5%), glucose (6%), xylose (17,4%) et galactose (23,2%)</p>	<p><b>In vitro</b>  <b>Fibroblastes dermiques humains (lignée cellulaire ATTC® PCS20101™) irradiés aux UVB (50 mJ/cm²)</b>  <b>Concentrations testées</b> : 25, 50 et 100 µg/ml                  1) Viabilité cellulaire avec ou sans irradiation aux UVB par test MTT  <b>Durée d'exposition</b> : 48 h                  2) Niveaux de ROS intracellulaires  <b>Durée d'exposition</b> : 30 min avant irradiation                  3) Activité intracellulaire de l'élastase et collagénase                  4) Expression de procollagène de type I et MMP-1, -2, -8, -9 et -13 par ELISA  <b>Durée d'exposition</b> : 2 h avant irradiation et suivi de 48 h d'incubation                  5) Expression de NF-κB, p-c-Jun et MAPK par WB  <b>Durée d'exposition</b> : 1 h (MAPK) ou 6 h (NF-κB, p-c-Jun) avant irradiation</p>	<p>1) Augmentation dose-dépendante de la viabilité cellulaire avec ou sans irradiation aux UVB (max : +20%)                  2) Réduction dose-dépendante du niveau de ROS intracellulaires de 22 à 48%                  3) Diminution dose-dépendante des activités intracellulaires de collagénase et élastase                  4) Augmentation dose-dépendante de l'expression protéique de procollagène de type I                  Diminution dose-dépendante de l'expression protéique de MMP-1, -2, -8 et -9                  5) Diminution dose-dépendante de l'expression protéique des sous-unités p50 et p65 de NF-κB, de p-c-Jun (phosphorylation d'AP-1)                  Diminution de la phosphorylation de p38, JNK et ERK</p>	Anti-photovieillessement Anti-vieillessement	(Wang <i>et al.</i> , 2018)
Sargassum hemiphyllum	<p>Polysaccharides sulfatés riches en fucose de différents PM obtenus par dépolymérisation</p>	<p><b>In vitro</b>  <b>Fibroblastes de prépuce humains (Hs68) irradiés aux UVB (40 mJ/cm²)</b>  <b>Concentrations testées</b> : 50, 100 et 500 µg/ml  <b>Durée d'exposition</b> : 24 h après irradiation                  1) Viabilité cellulaire par test MTT</p>	<p>1) Diminution dose-dépendante de la mort cellulaire en présence de HF et LF dès 50 µg/ml et AF dès 100 µg/ml                  Aucun effet significatif en présence de DF                  2) Diminution dose-dépendante de la production de ROS intracellulaires en présence de HF, AF et LF dès 100 µg/ml</p>	Anti-photovieillessement	(Hwang <i>et al.</i> , 2017)

## Chapitre 1 : Revue de la littérature

	<p>par hydrolyse enzymatique:          - HF = 270 kDa          - DF = 268 kDa          - AF = 0,8 kDa          - LF = 0,8 kDa</p>	<p>2) Niveaux de ROS intracellulaires par fluorescence          3) Activité de liaison de l'AP-1 par kit TransAM® AP-1 (Active Motif)          4) Niveau d'expression transcriptomique des ARNm de MMP-1, -2, -8, -9, -13, TβRII, procollagène de type I par RT-qPCR          5) Niveau d'expression protéique du collagène de type I par WB et transcriptomique des ARNm par RT-qPCR</p>	<p>3) Diminution significative de l'activité de liaison de l'AP-1 en présence de HF, LF, DF et AF à 500 µg/ml          4) Diminution des niveaux d'expression des ARNm de MMP-1, -2, -8, -9 et -13 en présence de HF, LF, DF et AF à 500 µg/ml          Augmentation significative du niveau d'expression d'ARNm de TβRII en présence de HF, LF, DF et AF à 500 µg/ml          5) Augmentation significative de l'expression des ARNm du collagène de type I en présence de HF, DF et LF à 500 µg/ml          Augmentation significative de la synthèse protéique de collagène de type I en présence de HF et LF à 500 µg/ml</p>		
<i>Sargassum filipendula</i>	<p>Hétérofucanes : fraction active SF0.5V</p>	<p><b>In vitro</b>  <b>S. epidermidis ATCC-35984</b>  <b>Concentrations testées</b> : 0,5, 1,0, 1,5 et 2 mg/ml  <b>Durée d'exposition</b> : 24 h          1) Suivi de croissance bactérienne          2) Formation de biofilm évaluée par cristal violet</p>	<p>1) Absence d'activité antibactérienne          2) Inhibition de la formation du biofilm (46,2 ± 0,04%)</p>	Antibiofilm	(Telles <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sargassum confusum</i>	<p>Polysaccharides sulfatés riches en fucose issus d'EAE par Celluclast et purifiés par précipitations éthanoliques successives</p> <p>SCF4 (20 kDa) composé de 44,9% de polysaccharides dont 36,1% de fucose, 23,6% de sulfates, 0,5% de polyphénols, 0,8% de protéines et 0,6% de matière minérale</p>	<p><b>In vitro</b>  <b>Kératinocytes HaCaT irradiés aux UVB (50 mJ/cm²)</b>  <b>Concentrations testées</b> : 25, 50, 100 et 200 µg/ml  <b>Durée d'exposition</b> : 2 h avant irradiation          1) Niveaux de ROS intracellulaires par fluorescence          2) Viabilité cellulaire par test MTT          3) Apoptose          4) Dommages à l'ADN par test comet          5) Cycle cellulaire par cytométrie de flux          6) Protéines de la barrière cutanée par WB          7) Immunomarquage de NF-κB p65</p>	<p>1) Diminution significative des niveaux de ROS intracellulaires dès 50 µg/ml          2) Augmentation significative de la viabilité cellulaire dès 25 µg/ml (97,24% à 100 µg/ml)          3+4) Réduction dose-dépendante de l'apoptose          5) Diminution dose-dépendante de la teneur en cellules sous-G1 apoptotiques          Augmentation dose-dépendante du potentiel transmembranaire interne mitochondrial          6) Rétablissement des niveaux de protéines et médiateurs moléculaires de la barrière cutanée          7) Suppression de l'activation des médiateurs des voies NF-κB (p65 et IκBα) et MAPK (phosphorylation de p38, ERK et JNK)</p>	Anti-photovieillessement	(Fernando <i>et al.</i> , 2020)
<i>Sargassum glaucescens</i>	<p>Extrait hydrosoluble : SGE, potentiellement enrichi en polysaccharides riches en fucose</p>	<p><b>In vitro</b>  <b>Fibroblastes lignées (CCD-966SK)</b>  <b>Kératinocytes épidermiques primaires humains</b>          1) Niveaux de ROS intracellulaires, induits par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suivis par cytométrie de flux  <b>Concentrations testées</b> : 125 et 250 µg/ml  <b>Durée d'exposition</b> : 1 h          2) Cicatrisation après blessure des fibroblastes et analyses photographiques  <b>Concentration testée</b> : 2 mg/ml  <b>Durée d'exposition</b> : 17 h          3) Viabilité cellulaire des fibroblastes après irradiation aux UVA (15 J/cm²) par test MTT  <b>Concentrations testées</b> : 62,5, 125, 250, 500 et 1000 µg/ml</p>	<p>1) Diminution dose-dépendante de la production de ROS intracellulaire (-23% et -40%)          2) Augmentation significative de la fermeture de la cicatrice (+295%)          3) Augmentation de la viabilité cellulaire des fibroblastes en présence SGE à partir de 250 µg/ml (+20%)          4) Augmentation de la prolifération cellulaire des kératinocytes (+20%) en présence de SGE aux concentrations de 31,25 et 62,5 µg/ml          5) Augmentation des niveaux d'expression des ARNm de SOD1, GSH-Px1 et des protéines de réparation à l'ADN des fibroblastes après irradiation aux UVA en présence de SGE aux concentrations de 500 et 1000 µg/ml</p>	Hydratation Antioxydante Anti-vieillessement	(Li <i>et al.</i> , 2019)



		<p><b>Durée d'exposition</b> : 24 h avant irradiation</p> <p>4) Prolifération cellulaire des kératinocytes par ELISA</p> <p><b>Concentrations testées</b> : 31,25 et 62,5 µg/ml</p> <p><b>Durée d'exposition</b> : 24 h</p> <p>5) Expression transcriptomique de gènes impliqués dans la barrière cutanée (<i>TGM1</i>, <i>KRT10</i>, <i>KRT14</i>, <i>FLG</i>), dans l'activité antioxydante (<i>SOD1</i>, <i>GSH-Px1</i>) et dans la réparation des dommages à l'ADN</p> <p><b>Concentrations testées</b> : 500 et 1000 µg/ml</p>	Augmentation des niveaux d'expression des ARNm de <i>TGM1</i> , <i>KRT10</i> et <i>FLG</i> en présence de SGE à 31,25 µg/ml après 6 et 12 h d'incubation et <i>KRT14</i> après 12 h		
Laminaria digitata	- Laminarine  - Oligosaccharides obtenus par dépolymérisation enzymatique de laminarine	<p><b>In vitro</b></p> <p><b>Fibroblastes dermiques humains issus d'une femme de 44 ans</b></p> <p><b>Kératinocytes épidermiques humains issus d'une femme de 34 ans</b></p> <p><b>Concentrations testées</b> : 0,1, 1, 10, 100 et 1000 µg/ml</p> <p><b>Durée d'exposition</b> : 24 h</p> <p>Néosynthèse protéique par radiomarquage de la leucine</p>	Augmentation de la néosynthèse protéique des fibroblastes (x1,3 en présence de laminarine et x1,4 en présence des oligosaccharides) et kératinocytes (x1,3 à 1,5 en présence de laminarine et x1,6 en présence des oligosaccharides)	Anti-vieillessement	(Yvin <i>et al.</i> , 1999)
	Laminarine	<p><b>In vitro</b></p> <p><b>Fibroblastes dermiques humains primaires</b></p> <p><b>Kératinocytes HaCaT et kératinocytes normaux épidermiques</b></p> <p><b>Concentrations testées</b> : 1, 10, 100, 500 et 1000 µg/ml</p> <p><b>Durées d'exposition</b> : 24, 48 et 72 h</p> <p>1) Viabilité cellulaire par test MTT</p> <p>2) Cytotoxicité cellulaire par test LDH</p> <p>3) Dosage de l'acide hyaluronique par kit ELISA</p> <p>4) Dosage du procollagène de type I par kit ELISA</p> <p>5) Niveaux de ROS intracellulaires après exposition au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou irradiation aux UVA (0,42 J/s/cm<sup>2</sup>), mesurés par fluorescence</p> <p>6) Étude des glycoprofiles : lectines et récepteurs de sucres</p> <p>7) Dosage d'IL-6 et -8 en conditions inflammatoires induites par LPS</p>	<p>1) Diminution significative de l'activité mitochondriale des fibroblastes et kératinocytes épidermiques et HaCaT après 24, 48 et 72 h en présence de laminarine aux concentrations de 500 et 1000 µg/ml majoritairement</p> <p>2) Aucune induction de la cytotoxicité cellulaire des fibroblastes et kératinocytes</p> <p>3+4) Aucune variation significative de l'expression d'acide hyaluronique et procollagène de type I</p> <p>5) Diminution significative des niveaux de ROS intracellulaires des fibroblastes et kératinocytes après exposition au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou irradiation aux UVA en présence de laminarine aux concentrations de 1, 10 et 100 µg/ml</p> <p>6) Augmentation significative de l'interaction avec la lectine <i>Wheat Germ Agglutinin</i></p> <p>7) Diminution significative de l'IL-6 en présence de laminarine à 10 µg/ml au niveau des fibroblastes (-27%) et des kératinocytes épidermiques (-54%)</p>	Antioxydante Anti-inflammatoire	(Ozanne <i>et al.</i> , 2020)
Sargassum vachellianum	Extrait de polysaccharides sulfatés riches en fucose	<p><b>In vitro</b></p> <p><b>Staphylococcus aureus</b></p> <p><b>Durée d'exposition</b> : 24 h</p> <p>Activité antibactérienne par test de diffusion sur disque de gélose + MIC (Concentration Minimale d'Inhibition)</p> <p><b>Concentrations testées</b> : 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 1 mg/ml</p>	Aucune activité d'inhibition de la croissance de <i>S. aureus</i>	Maintien du microbiote cutané	(Jesumani <i>et al.</i> , 2020)
Chlorophyceae	Ulvanes de différents PM : ULVAN-01 (57 kDa) ULVAN-DEP (4 kDa) obtenu par dépolymérisation sur résine échangeuse d'ions	<p><b>In vitro</b></p> <p><b>Fibroblastes dermiques humains (lignée cellulaire ATCC®CRL-2072™ issue d'une femme âgée de 20 ans)</b></p> <p><b>Concentrations testées</b> : 10, 100 et 500 µg/ml</p> <p>1) Prolifération cellulaire par test MTT</p> <p><b>Durée d'exposition</b> : 48 h</p> <p>2) Production de collagène par test au rouge Sirius</p> <p><b>Durée d'exposition</b> : 48 h</p> <p>3) Dosage de l'acide hyaluronique par kit ELISA</p> <p><b>Durée d'exposition</b> : 72 h</p>	<p>1) Diminution significative, dose-dépendante, de la prolifération cellulaire en présence d'ULVAN-01 ; diminution significative de la prolifération cellulaire en présence d'ULVAN-DEP à 500 µg/ml</p> <p>2) Aucune modification de la synthèse de collagène total au niveau protéique</p> <p>3) Augmentation significative, dose-dépendante, de la production d'acide hyaluronique en présence d'ULVAN-01 et ULVAN-DEP</p>	Anti-vieillessement	(Adrien <i>et al.</i> , 2017b)

<i>Ulva reticulata</i>		<b>In vitro</b> <b>Staphylococcus aureus</b> Croissance bactérienne par méthode de diffusion sur disque d'agar <b>Concentrations testées</b> : 10 mg/ml <b>Durée d'exposition</b> : 24 h	Aucune activité antibactérienne contre <i>S. aureus</i>	Maintien du microbiote cutané	(Tran <i>et al.</i> , 2018)
<i>Ulva prolifera</i>	Ulvanes bruts Ulvanes purifiés de 137 kDa composé de 18% de sulfate	<b>In vitro</b> <b>Fibroblastes dermiques HSF blessés par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> <b>Durée d'exposition</b> : 1 h avant exposition à H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1) Niveaux de ROS intracellulaires, mesurés par fluorescence Dosage de MDA, CAT et GSH-PX <b>Concentrations testées</b> : 500 µg/ml 2) Prolifération cellulaire par test MTT <b>Concentrations testées</b> : 100, 200, 300, 400 et 500 µg/ml	1) Diminution de la production de ROS intracellulaires en présence d'ulvanes bruts Augmentation significative de GSH-PX (+51%) et CAT (+46,9%), et diminution significative de MDA (-5,3%) en présence d'ulvanes bruts 2) Augmentation significative et dose-dépendante de la prolifération cellulaire en présence des ulvanes bruts et purifiés (+54,4% et +74,6% à 500 µg/ml respectivement)	Antioxydante	(Cai <i>et al.</i> , 2016)
<i>Ulva pertusa</i>	Ulvanes hydrolysés par décomposition acide	<b>In vitro</b> <b>Fibroblastes dermiques humains pré- et sénescents issus de prépuce</b> 1) Prolifération cellulaire <b>Concentration testée</b> : 250 µg/ml <b>Durée d'exposition</b> : 72 h 2) Synthèse de la protéine sécrétée CCN1 par WB et intracellulaire par ELISA <b>Concentrations testées</b> : 100 et 250 µg/ml <b>Durée d'exposition</b> : 48 h 3) Synthèse protéique de procollagène de type I et MMP-1 par ELISA et transcriptomique par RT-qPCR <b>Concentrations testées</b> : 100 et 250 µg/ml pour ELISA et 100, 250 et 500 µg/ml pour RT-qPCR <b>Durée d'exposition</b> : 48 h	1) Augmentation significative de la prolifération cellulaire des fibroblastes sénescents et non significative des pré-sénescents en présence des ulvanes hydrolysés 2) Diminution significative, dose-dépendante, de l'expression de la protéine CCN1 intracellulaire et excrétée par les fibroblastes sénescents en présence des ulvanes hydrolysés 3) Augmentation significative de l'expression de collagène de type I et diminution significative de MMP-1 au niveau protéique et transcriptomique des fibroblastes sénescents en présence des ulvanes hydrolysés	Anti-vieillessement	(Ko <i>et al.</i> , 2013)
<i>Ulva sp.</i>	- Ulvanes bruts et purifiés (> 670 kDa) - Ulvanes dépolymérisés appauvris en sulfates (7 et 1,5 kDa)	<b>In vitro</b> <b>Fibroblastes dermiques humains issus d'abdominoplastie de sujets de sexe féminin</b> <b>Concentration testée</b> : 50, 100, 250, 500 et 1000 µg/ml <b>Durée d'exposition</b> : 24 et 48 h Prolifération cellulaire évaluée par test WST-1	Augmentation de la prolifération cellulaire temps-dépendante et significative après 48 h d'incubation	Anti-vieillessement	(Fournière <i>et al.</i> , 2019)

**α-SMA** : « alpha Smooth Muscle Actin » ; **Akt** : protéine kinase B ; **AP-1** : « Activator Protein-1 » ; **ARN** : Acide RiboNucléique ; **ARNm** : ARN messenger ; **ATCC** : « American Type Culture Collection » ; **CAT** : CATalase ; **CCN1** : « Cysteine-rich angiogenic protein 61 » ; **Cdc-42** : « Cell division control protein 42 » ; **CE<sub>50</sub>** : Concentration Efficace médiane ; **CI<sub>50</sub>** : Concentration Inhibitrice médiane ; **ELISA** : « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » ; **ERK** : « Extracellular signal-Regulated Kinases » ; **FLG** : FilLaGrine ; **GAPDH** : GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase ; **GSH-Px** : Gluthatione Peroxydase ; **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène ; **IkB** : « Inhibitor of NF-κB » ; **JNK** : « c-Jun-N-terminal kinase » ; **KRT** : KéRaTine ; **MAPK** : « Mitogen-Activated Protein Kinases » ; **MDA** : MalonDiAldéhyde ; **MEC** : Matrice ExtraCellulaire ; **MMP** : MétalloProtéinases Matricielles ; **MTT** : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium ; **NF-κB** : « Nuclear Factor-kappa B » ; **PM** : Poids Moléculaire ; **ROS** : « Reactive Oxygen Species » ; **Rac-1** : « Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 » ; **RT-qPCR** : « Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction » ; **SOD** : SuperOxyde Dismutate ; **TβR** : « Transforming growth factor beta Receptor » ; **TGM1** : TransGlutaMinase 1 ; **TIMP** : « Tissue Inhibitor of MetalloProteases » ; **TLR** : « Toll-Like Receptors » ; **UV** : UltraViolet ; **VEGFA** : « Vascular Endothelial Growth Factor A » ; **WB** : Western Blot ; **WST-1** : 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H-tétrazolium.

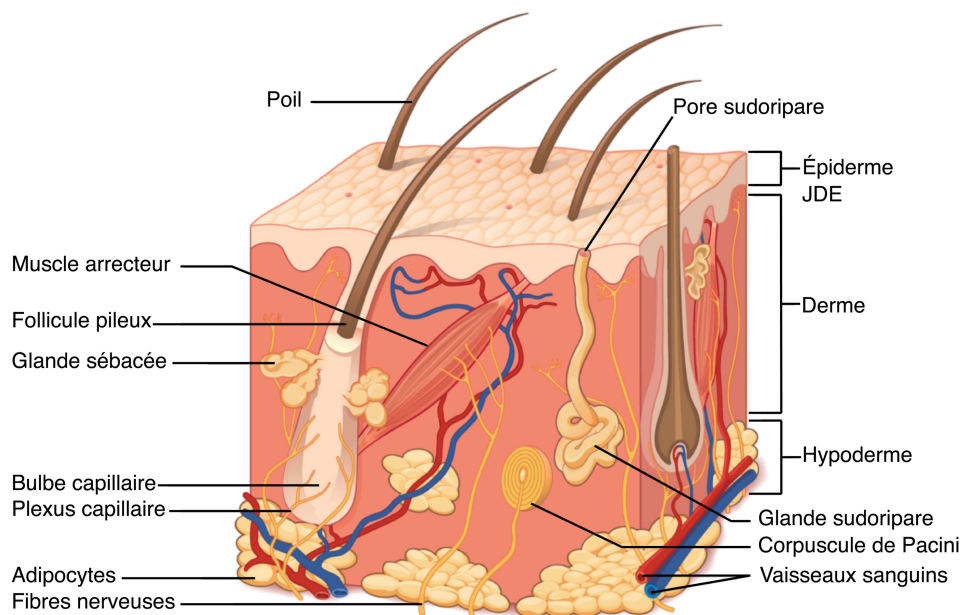


## II. Le système cutané : structure et rôle

La **peau** est un organe complexe de protection, première interface entre le corps et l'environnement extérieur. La peau sert de barrière physique et limite l'entrée de substances chimiques ou de microorganismes, ainsi que l'évaporation et la perte de chaleur. Elle représente chez l'adulte une surface totale d'environ 2 m<sup>2</sup> et un poids moyen de 5 kg avec généralement une épaisseur ne dépassant pas les 2 mm. Elle constitue donc l'organe le plus grand du corps humain.

La peau est un tissu mésenchymateux et épithélial complexe, associant des éléments tissulaires variés (nerveux, vasculaires, musculaires, épithéliaux et conjonctifs), composé de multicouches organisées en trois composants majeurs (Figure 20) : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

L'**épiderme**, essentiellement composé de cellules épithéliales, est la couche la plus superficielle. Les annexes épidermiques, follicules pilosébacés, les glandes sudoripares et les phanères sont rattachées à l'épiderme. La **Jonction Dermo-Epidermique (JDE)** est une membrane basale complexe, à l'aspect ondulé, interface entre l'épiderme et le derme, principalement constituée de collagènes de type IV et VII, de glycoprotéines de structure (laminine et nidogène) et de Protéoglycanes (PG) comme le perlécane (Marionnet *et al.*, 2006). Le **derme**, tissu conjonctif vascularisé, contenant des fibres élastiques et de collagènes, apporte support et nutrition aux cellules de l'épiderme. Il est attaché à l'épiderme par la JDE. L'**hypoderme**, plus profond, d'épaisseur variable, correspond à un tissu adipeux richement vascularisé. Il est rattaché au derme par des fibres de collagènes et des fibres élastiques. Ce tissu, composé d'adipocytes blancs (majoritaires) et bruns disposés en lobules graisseux remplis de triglycérides, constitue le compartiment majoritaire de stockage de la graisse corporelle (environ 80% de la masse adipeuse du corps) (Barbieri *et al.*, 2014 ; Tachdjian *et al.*, 2016 ; Lai-Cheong & McGrath, 2017).

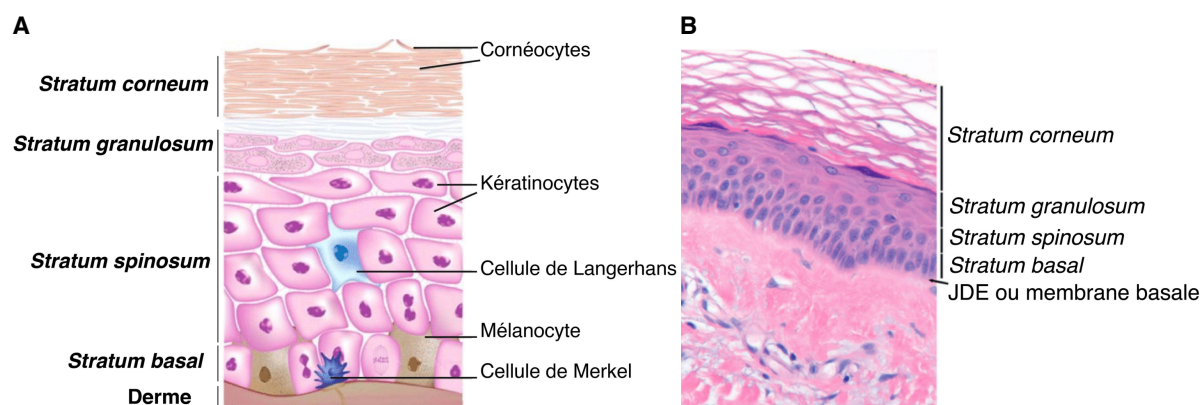


**Figure 20 : Schéma de la structure de la peau et de ses annexes**  
Modifié d'après Li (2020).

## A. Focus sur l'épiderme et le derme cutané

### 1. L'épiderme

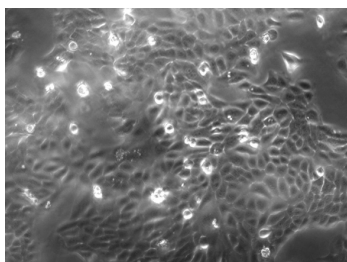
L'**épiderme** est un **épithélium pavimenteux stratifié, kératinisé, innervé** (à l'exception de la couche cornée) et **avascularisé**, constituant la couche la plus externe de la peau. Il mesure en moyenne 0,4 mm d'épaisseur (0,03 mm au plus fin au niveau des paupières et jusqu'à 1,5 mm au plus épais au niveau des paumes de mains et plantes de pieds) (Barbieri *et al.*, 2014). L'épiderme est constitué de quatre types cellulaires (Figure 21A) : les **kératinocytes** d'origine ectoblastique, les **mélanocytes** (cellules dendritiques provenant des crêtes neurales synthétisant la mélanine, responsable de la pigmentation de la peau, et protégeant la peau contre les radiations UV), les **cellules de Langerhans** (cellules dendritiques dérivant de la moëlle hématopoïétique, présentatrices d'antigènes) et les **cellules de Merkel** (cellules épithéliales issues de l'épiderme embryonnaire à fonction neuroendocrine) (Barbieri *et al.*, 2014 ; Marks & Miller, 2017 ; Lai-Cheong & McGrath, 2017). Le renouvellement de l'épiderme est effectué en 30 à 50 jours (Barbieri *et al.*, 2014 ; Lai-Cheong & McGrath, 2017).



**Figure 21 : Organisation de l'épiderme cutané humain**

(A) Représentation schématisée et (B) Visualisation par microscopie optique (coloration hématoxyline-éosine). Modifié d'après Barbieri *et al.* (2014).

Les **kératinocytes** sont les **cellules majoritaires** de l'épiderme représentant 95% de la population totale cellulaire de cette couche et occupant 80% de l'espace (Figure 22). La principale caractéristique des kératinocytes est sa capacité de différenciation, et de production de la **kératine**, protéine fibreuse conférant la fonction de protection. Au cours du processus de différenciation, la composition en kératine change. En effet, les kératinocytes basaux synthétisent les kératines 5 et 14 tandis que dans la couche cornée, ces kératines 5 et 14 sont absentes et les kératines 1 et 10 sont exprimées (Xu *et al.*, 2019).



**Figure 22 : Microscopie optique de kératinocytes HaCaT à 80% de confluence (x10)**

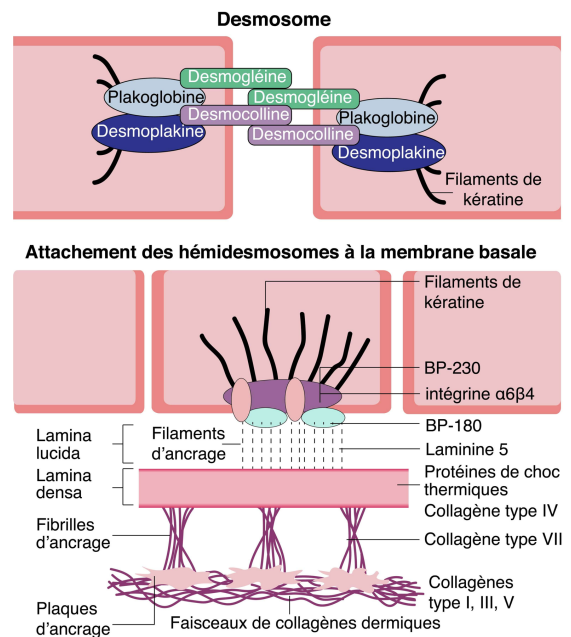
L'épiderme se divise en quatre couches principales superposées en fonction du stade de différenciation des kératinocytes (Figure 21A et B) :

- La couche basale ou ***stratum basal***.
- La couche épineuse ou ***stratum spinosum***.
- La couche granuleuse ou ***stratum granulosum***.
- La couche cornée ou ***stratum corneum***.

Le **stratum basal** est constitué d'une seule couche de **kératinocytes basaux indifférenciés**, en **prolifération**, qui repose sur la membrane basale. Les kératinocytes basaux se divisent en trois catégories de population : les **cellules souches de l'épiderme** au niveau des crêtes épidermiques inter-papillaires, les **cellules amplificatrices** engendrant des cellules filles qui migreront vers les couches supérieures et commenceront leur processus de différenciation, et les **cellules post-mitotiques** qui restent en position basale (Kaur & Li, 2000). Les kératinocytes basaux sont liés entre eux par les **desmosomes**, et à la membrane basale par les **hémidesmosomes** (Figure 23) (Norris, 2011).

Les desmosomes sont composés d'un certain nombre de molécules d'adhésion comprenant les protéines transmembranaires notamment les desmogléines et desmocollines, qui sont liées aux filaments intermédiaires intracytoplasmiques de kératine par la plakoglobine et la desmoplakine.

Les cellules du **stratum basal** sont liées à la membrane basale *via* des protéines contenues dans les hémidesmosomes du bord supérieur de la **lamina lucida** (antigène de la pemphigoïde bulleuse 1 et 2 : BP-230 et BP-180, et l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$ ). Ces protéines interagissent avec la kératine intracellulaire et avec des protéines de la membrane basale, notamment la **laminine 5** et le **collagène type VII** de la lamina lucida qui rejoint le **collagène de type IV** de la lamina densa (Green & Jones, 1997).



**Figure 23 : Représentation schématique d'un desmosome et d'un hémidesmosome**  
Modifié d'après Norris (2011).

Le **stratum spinosum** est composé de cinq à dix couches de kératinocytes liés entre eux par les desmosomes. Le nombre important de desmosomes présents dans cette couche lui confère une grande résistance mécanique et participe à l'intégrité structurale de la peau (Barbieri *et al.*, 2014).

Le **stratum granulosum** a une épaisseur variant d'une à dix cellules. Les kératinocytes de cette couche synthétisent davantage de kératine et deviennent plus aplatis et de forme irrégulière. Les cellules sont dites granulaires car elles contiennent des granules sombres composées de **kératohyaline** (Barbieri *et al.*, 2014). La kératohyaline contient deux protéines, la **profilaggrine** (précurseur de la filaggrine) et l'**involucrine**, utilisées au niveau du **stratum corneum** (Dale *et al.*, 1987 ; Günzel *et al.*, 1991). En effet, la filaggrine joue un rôle dans l'agrégation des filaments de kératine au sein du **stratum corneum** et l'involucrine a un rôle dans la formation de l'enveloppe cellulaire des cornéocytes du **stratum corneum**. Les cellules granulaires possèdent également des **granules lamellaires** contenant des polysaccharides, des glycoprotéines et des lipides, expulsés ensuite dans l'espace intercellulaire afin de former le « ciment » qui maintient ensemble les cellules du **stratum corneum** (Marks & Miller, 2017).

Le **stratum corneum** se compose de cinq à vingt couches de cellules. Cette couche cornée, **la plus superficielle**, est en contact direct avec l'environnement extérieur. Le *stratum corneum* est une membrane semi-perméable qui limite la perte incontrôlée de fluide corporel et qui sert de barrière physiologique contre les agents extérieurs comprenant les bactéries, champignons, produits chimiques, pollution, etc. (Dréno, 2008 ; Barbieri *et al.*, 2014 ; Lai-Cheong & McGrath, 2017). Les cellules de la couche cornée sont appelées **cornéocytes**, et correspondent à des cellules mortes ayant perdu leurs noyaux et leurs organites cytoplasmiques (Lai-Cheong & McGrath, 2017). Les cornéocytes sont larges, plats, en forme de polyèdre avec une enveloppe en forme de plaque, comblée de **kératine**. Les cornéocytes sont empilés en couches verticales et maintenus entre eux par un « ciment » riche en lipides constitués d'Acides Gras (AG) insaturés, de céramide et de cholestérol (Marks & Miller, 2017). La membrane plasmique des cornéocytes contient une enveloppe insoluble fortement kératinisée, formée par la réticulation de précurseurs protéiques solubles : l'**involucrine** (marqueur de différenciation de la couche cornée) et la **loricrine** (Lai-Cheong & McGrath, 2017).

L'épiderme était considéré jusqu'à il y a encore quelques années comme la dernière couche cutanée faisant office de première ligne de défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Or, il a été récemment montré que l'épiderme humain était colonisé par des millions de microorganismes connus sous le nom de **microbiote cutané**. Ainsi, ce microbiote cutané pourrait être considéré comme une couche externe supplémentaire de l'épiderme (Baldwin *et al.*, 2017). La composition de ce microbiote cutané ainsi que son rôle dans la modulation du système cutané sont détaillés dans la section « III Le microbiote cutané » de ce manuscrit (p. 110).

## 2. Le derme

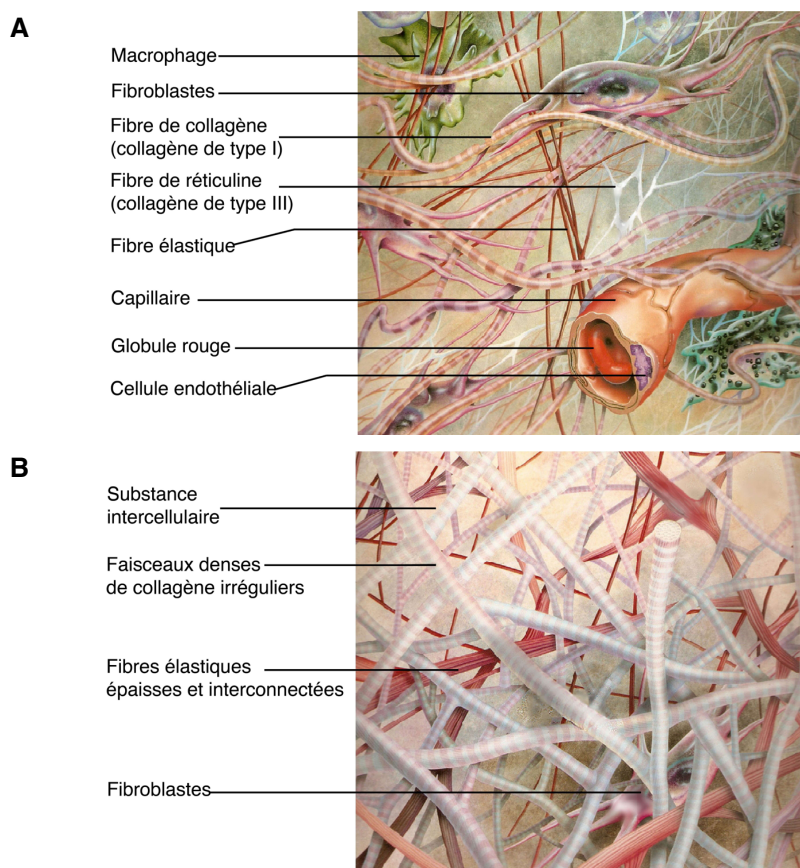
Le **derme** est un tissu fibreux dense, d'origine mésoblastique, qui sert de support à l'épiderme. Plus épais que l'épiderme, son épaisseur varie entre 1 et 4 mm. Ce tissu conjonctif exerce différentes fonctions métaboliques importantes : la **nutrition**, la **thermorégulation**, la **défense contre les pathogènes** et la **régénération tissulaire**. Le derme est **vascularisé**, *a contrario* de l'épiderme, et **innervé**. Les annexes cutanées (glandes sudoripares eccrines et apocrines, follicules pileux, glandes sébacées et ongles) se fixent sur la partie basale du derme.

Le derme est divisé en deux zones distinctes : le derme papillaire et le derme réticulaire (Figure 24).

Le **derme papillaire**, en partie superficielle, est en contact avec la JDE. Il est enclavé par les crêtes épidermiques. Il est formé d'un tissu conjonctif où les fibres de collagène sont fines (réticuline), entrelacées et orientées perpendiculairement ou obliquement à l'épiderme (Figure 24A). Il comporte beaucoup de vaisseaux sanguins et terminaisons nerveuses sensorielles. Les échanges nutritifs et gazeux s'effectuent au niveau de ce derme papillaire avec les couches profondes de l'épiderme.

Le **derme réticulaire**, profond, est en contact avec l'hypoderme sous-jacent. Plus dense, il est constitué d'un réseau de fibres de collagène plus épaisses, moins organisées et disposées horizontalement par rapport à la surface de la peau (Figure 24B). Il représente la majeure partie du derme. Il contient également de petites artérioles, veinules, nerfs, follicules pilosébacés et les canaux excréteurs des glandes sudoripares (Sorrrell & Caplan, 2004).





**Figure 24 : Schéma (A) du derme papillaire et (B) du derme réticulaire**  
Modifié d'après Geras (1990).

Plusieurs types cellulaires constituent la matrice dermique : les **fibroblastes**, les **dendrocytes**, les cellules du Système Immunitaire (SI) comme les **lymphocytes**, les **mastocytes** et les **macrophages**. Cependant, les fibroblastes sont les cellules majoritaires du derme. Ils sont responsables de la synthèse de molécules de la **Matrice ExtraCellulaire (MEC)** (Prost-Squarcioni *et al.*, 2008).

#### **a) Les cellules minoritaires du derme**

Les **cellules dendritiques dermiques** sont des cellules mésenchymateuses présentatrices d'antigènes qui permettent le déclenchement de réponses immunitaires (Bouloc, 2001).

Les **mastocytes** sont des cellules arrondies du derme d'origine médullaire. Ils représentent 2 à 8% de la population cellulaire du derme et se trouvent à proximité de la JDE, autour des petits vaisseaux et terminaisons nerveuses. Les mastocytes ont un rôle dans l'inflammation médiée par les immunoglobulines E, impliquées dans la reconnaissance des allergènes. Ils ont également un rôle majeur dans la réparation et le remodelage tissulaire communément appelées cicatrisation, *via* la modulation de la phase inflammatoire, de la phase de contraction, de la prolifération des fibroblastes et du dépôt de la MEC. Les mastocytes sont riches en héparine, histamine et protéoglycanes à chondroïtine sulfate (Benyon, 1989).

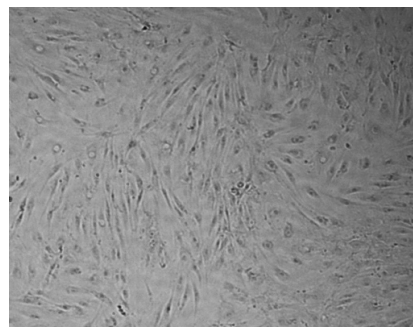
Les **Lymphocytes T (LT)**, impliqués dans l'immunité et l'homéostasie cutanée, proviennent de la circulation sanguine et peuvent se situer au niveau du derme papillaire en proportions variables (Mueller *et al.*, 2014).

Les **macrophages**, acteurs importants de l'immunité innée, appartiennent à la famille des phagocytes mononucléés, dérivant des monocytes. Le renouvellement des macrophages, en situation d'homéostasie, se fait à partir de macrophages résidents. Ce sont des cellules rondes ou anguleuses, avec un noyau réniforme, excentré, contenant des lysosomes, des vésicules d'endocytose, des endosomes et des phagosomes. Ils expriment différents récepteurs de surface : les clusters de différenciation (CD) comme les CD4, CD11, CD14, CD15, CD16 et CD68, capables de reconnaître les cibles à phagocyter (Yanez *et al.*, 2017).

### b) Les fibroblastes : cellules majoritaires du derme

Les **fibroblastes** sont les cellules principales du derme. Ces cellules viennent de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses multipotentes.

Ces cellules sont **fusiformes** ou étoilées, longues de 100  $\mu\text{m}$ , et développent des **prolongements cytoplasmiques** très fins, parfois ramifiés (Figure 25). Les fibroblastes dermiques constituent une population très hétérogène puisque l'on y retrouve : les fibroblastes-fibrocytes, les fibroclastes et les myofibroblastes.



**Figure 25 : Microscopie optique de fibroblastes dermiques cutanés humains à 80% de confluence (x10)**

Les **fibroblastes-fibrocytes** sont des cellules présentes dans tous les tissus conjonctifs matures. Les fibroblastes désignent les cellules jeunes très actives, capables de devenir des fibrocytes, moins actifs, pouvant être réactivés à la demande. Avec l'âge, leur capacité à proliférer diminue. Les **fibroclastes** sont des fibroblastes avec une activité phagocytaire vis-à-vis du collagène. Les **myofibroblastes** sont des fibroblastes apparaissant au cours du processus de cicatrisation. Les fibroblastes peuvent se transformer en myofibroblastes, riches en  $\alpha$ -SMA (« alpha Smooth Muscle Actin ») et en myosine, avec la capacité de synthétiser la MEC et de présenter une activité contractile (Prost-Squarcioni *et al.*, 2008).

Deux sous-populations de fibroblastes se répartissent dans les deux zones du derme : les fibroblastes dermiques papillaires et les fibroblastes dermiques réticulaires. Ces fibroblastes dermiques et réticulaires se différencient également par la composition et l'organisation de leur MEC.

Les **fibroblastes dermiques papillaires** sont situés dans le derme papillaire superficiel. Ils se divisent plus rapidement que les fibroblastes réticulaires. Les **fibroblastes dermiques réticulaires** sont situés dans le derme réticulaire profond. Ces fibroblastes réticulaires ont une capacité contractile supérieure aux papillaires.

Les fibroblastes sont à l'origine de la synthèse et de l'organisation des constituants de la **MEC** comme le **collagène**, l'**élastine**, les **GlycosAminoGlycanes (GAG)**, les **ProtéoGlycanes (PG)**, les **glycoprotéines** de structure, ainsi que de la dégradation de cette MEC *via* la synthèse d'enzymes comme les **métalloprotéinases matricielles (MMP)**, « Matrix MetalloProteinases ». Ils ont un rôle majeur dans la réparation tissulaire et le vieillissement cutané (Prost-Squarcioni *et al.*, 2008).

## B. La matrice extracellulaire du derme

La MEC est composée de nombreuses macromolécules dont les protéines fibreuses comme les **collagènes** (90%) et l'**élastine** (2 à 4%), les **glycoprotéines**, les **protéoglycanes** et les **glycosaminoglycanes**. Une présentation simplifiée des composants de la MEC est réalisée sur la Figure 26.

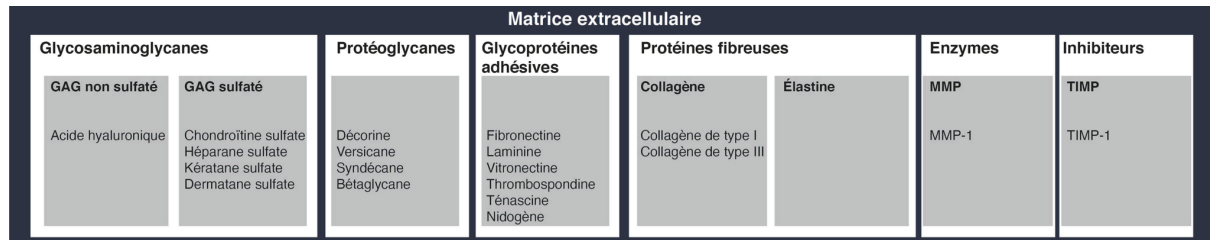


Figure 26 : Principaux composants de la MEC du derme cutané

La MEC est continuellement en remodelage au sein du derme. Des mécanismes contrôlant sa synthèse, **phase anabolique** (fibrogénèse), et sa dégradation, **phase catabolique** (fibrolyse), régulent ce remodelage. Dans un derme sain, les facteurs mis en jeu sont de deux types : les facteurs anaboliques et les facteurs cataboliques.

Les **facteurs anaboliques** comme le **TGF-β1** (« Transforming Growth Factor-β1 »), ou l'**IGF-1** (« Insulin-like Growth Factor-1 ») stimulent la production de collagènes, de protéoglycanes ou d'élastine synthétisés par les fibroblastes, ou inhibent la synthèse de MMP. Ils stimulent également la production de TIMP (« Tissue Inhibitor of MetalloProteases ») qui inhibent l'activité de ces MMP.

Les **facteurs cataboliques** comme le **TNF-α** (« Tumor Necrosis Factor-α »), l'**IL-1β** (l'InterLeukine-1β) ou l'**IFN-γ** (InterFéron-γ) inhibent l'expression des marqueurs de la matrice dermique et des TIMP, et induisent la synthèse d'enzyme protéolytiques comme les MMP.

### 1. L'élastine

L'élastine, protéine hydrophobe riche en lysine, est formée de l'assemblage de monomères d'un précurseur : la **tropoélastine**. Les molécules de tropoélastine ont la capacité à changer de conformation : **contraction** ou **élongation** (Figure 27). La dégradation de l'élastine se fait par une enzyme : l'**élastase**. L'élastine est stabilisée par des structures moléculaires formées par l'association d'acides aminés (4 chaînes latérales de lysine) : la **desmosine** et l'**isodesmosine**. Dans le derme, les **fibres élastiques** sont composées à 15% de microfibrilles et à 85% d'élastine matricielle (Barbieri *et al.*, 2014). Elles ont pour fonction principale de donner à la peau son élasticité (Prost-Squarcioni *et al.*, 2008). En effet, l'élastine est mille fois plus flexible que le collagène.

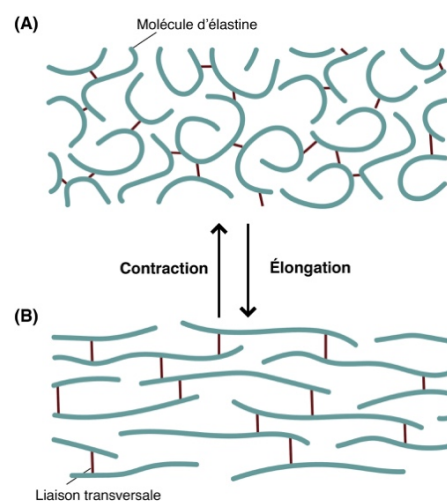


Figure 27 : Schéma de l'organisation des molécules d'élastine incorporées dans la fibre après pontage des molécules de tropoélastine dans la fibre (A) relâchée et (B) étirée

Modifié d'après Kristensen *et al.* (2019).

L'élastine comporte plusieurs domaines hydrophobes interconnectés, dominés par des résidus valine, glycine et proline. Sous l'effet de la lysyl oxydase les résidus lysine de l'élastine sont oxydés en allysine ce qui permet le pontage aldolique entre des molécules d'élastine et de collagène aboutissant au renforcement de la cohésion de la MEC. En plus de ces domaines hydrophobes, l'élastine comporte d'autres domaines multiples riches en hydroxyproline et allysine, en polyalanine ou en alanine (Kristensen *et al.*, 2019).

Au niveau du derme et de l'hypoderme, on distingue trois types de fibres élastiques :

- Les **fibres oxytalanes** du derme papillaire qui sont constituées exclusivement de microfibrilles.
- Les **fibres d'élaunine** (immatures) qui sont localisées entre le derme papillaire et réticulaire.
- Les **fibres élastiques matures** qui sont constituées d'élastine.

Les microfibrilles sont constituées majoritairement de fibrilline I et forment une trame sur laquelle se fixe l'élastine (fibres d'élaunine et fibres élastiques matures) ou non (fibres oxytalanes) (Prost-Squarcioni *et al.*, 2008). Pendant la formation de fibres élastiques, l'élastine se lie à d'autres molécules de la MEC comme les fibulines (4 et 5) et les fibrillines (Kristensen *et al.*, 2019).

## 2. Les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes

Les GAG sont divisés en deux catégories : les GAG sulfatés et les GAG non sulfatés (Figure 28).

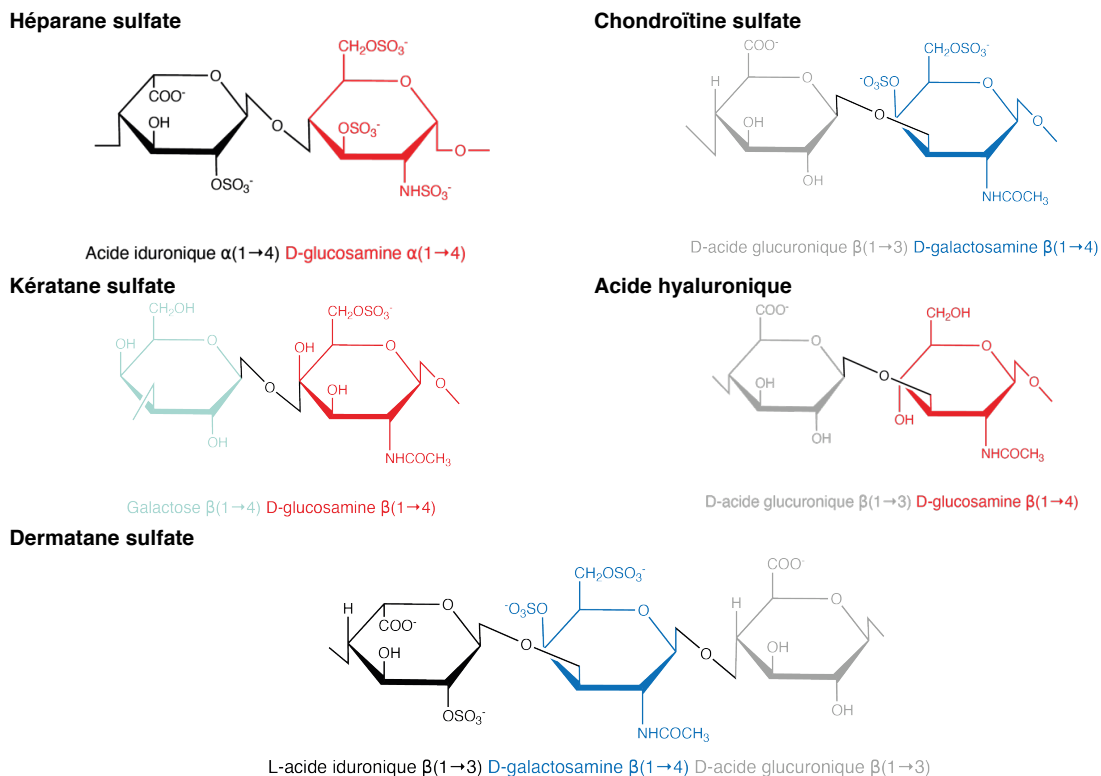


Figure 28 : Structures disaccharidiques des GAG de la MEC cutanée

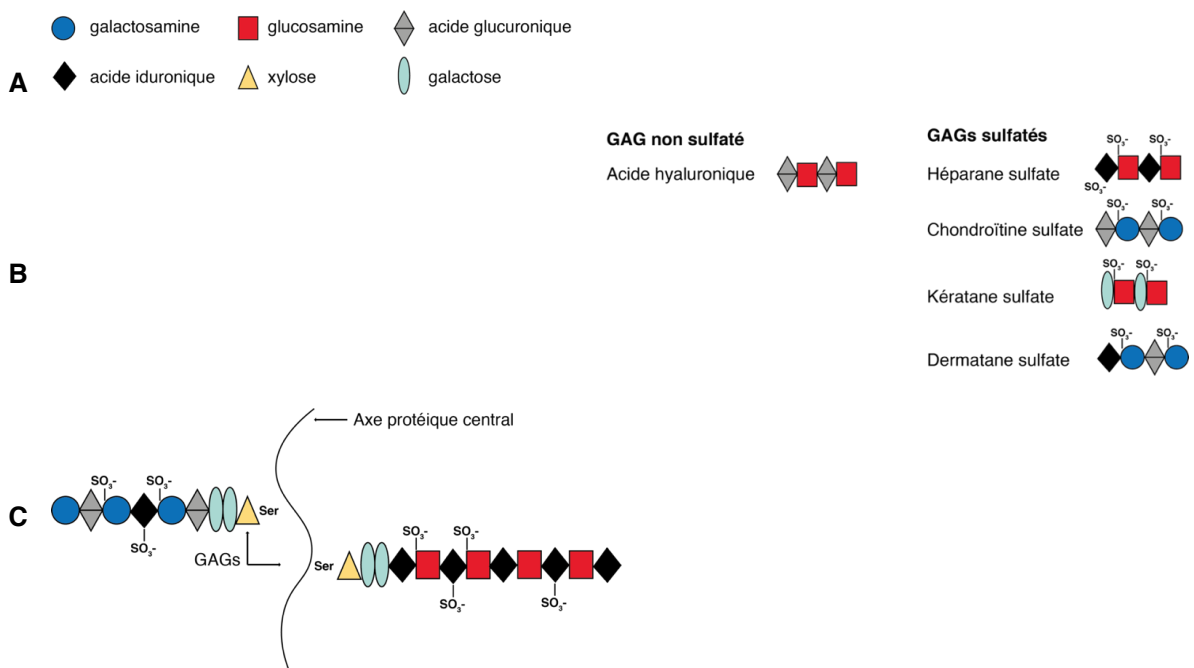
L'**Acide Hyaluronique (AH)**, ou hyaluronane, est un très grand **GAG non sulfaté** de 2000 à 25000 disaccharides : répétitions d'**acide D-glucuronique** et de **D-N-acétyl-glucosamine** liés par des liaisons glycosidiques alternées  $\beta$ -1,3 et  $\beta$ -1,4 (Figures 28 et 29B).



Ce polymère, de 2 à 25 µm de long, présente des faces chargées dues aux groupements carboxyles de l'acide glucuronique et des faces hydrophiles dues à des clusters d'atomes d'hydrogène. Il est synthétisé sur la face interne de la membrane par les hyaluronanes synthétases, protéines intégrées à la membrane, qui polymérisent et transloquent ensuite l'AH hors de la cellule, dans la MEC. Au niveau de la MEC, l'AH peut être dégradé par des hyaluronidases. L'AH occupe donc une place importante au sein de la MEC du fait de la répulsion mutuelle de ses groupements carboxyles et **attire l'eau** au sein de sa molécule. L'AH a un **rôle de structure** *via* sa capacité à contenir l'eau, et peut interagir avec des récepteurs de surface (CD44) et activer des voies de signalisation modifiant la migration et la prolifération cellulaire (Prost-Squarcioni *et al.*, 2008).

Les **GAG sulfatés** sont des chaînes linéaires sulfatées, chargées négativement, composées de la répétition d'un diholoside de base contenant une **hexosamine** (glucosamine ou galactosamine) et un **autre ose** (acide glucuronique, acide iduronique, xylose ou galactose) (Figure 29A). Les principaux GAG sulfatés sont : les **chondroïtines sulfates** (A et C), l'**héparane sulfate**, le **kératane sulfate** et le **dermatane sulfate** (Figures 28 et 29B). Le dermatane sulfate est majoritaire au niveau de la MEC puisqu'il représente plus de 80% des GAG dermiques (Gandhi & Mancera, 2008).

Les **Protéoglycans** (PG) sont formés d'un axe protéique central (protéine centrale ou cœur) sur lequel se greffe des chaînes de GAG sulfatés par liaisons covalentes (Figure 29C). La synthèse de l'axe protéique et la fixation des GAG se fait dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi des fibroblastes. Les principaux PG de la substance fondamentale du derme, interstitiels, sont la décorine et le versicane (Prost-Squarcioni *et al.*, 2008). La **décorine**, riche en leucine, ne fixe qu'une seule chaîne de dermatane sulfate. Le **versicane**, PG à chondroïtine sulfate, est capable de se fixer de façon non covalente à l'AH par l'intermédiaire d'une protéine de liaison (Smith & Melrose, 2015).



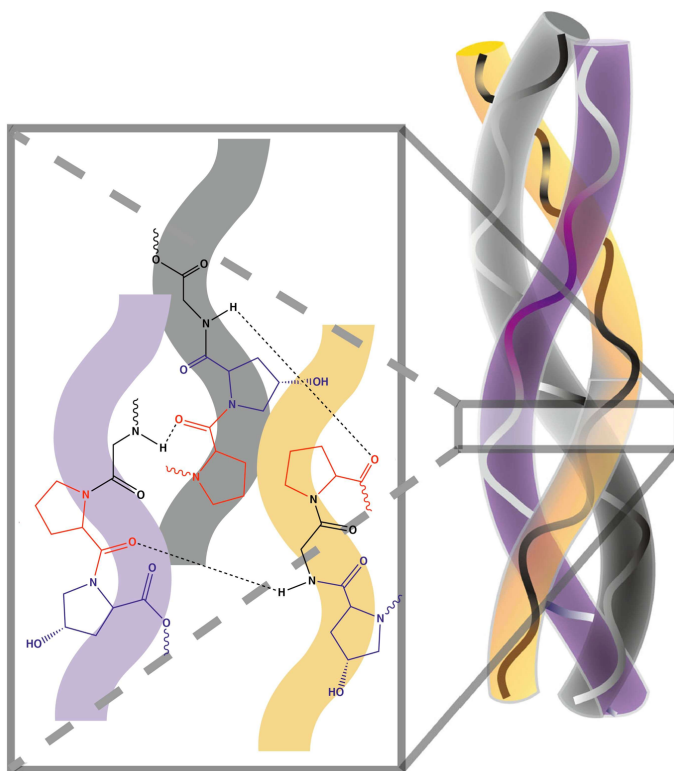
**Figure 29 : Schéma de la composition des GAG et PG avec (A) les holosides de base, (B) le GAG non sulfaté principal (AH) et les GAG sulfatés (chondroïtine sulfate, dermatane sulfate, héparane sulfate) et (C) les protéoglycans**  
Modifié d'après Prost-Squarcioni *et al.* (2008).

Dans la MEC du derme, au niveau des fibroblastes, on trouve également des PG transmembranaires : les syndécanes et le bétaglycane. Les **syndécanes 1, 2 et 4** constituent une famille où la protéine centrale est intégrée à la membrane cytoplasmique. Le **bétaglycane** (récepteur du TGF- $\beta$ 3) appartient à la famille des glypicans (PG à l'héparane sulfate) où la protéine centrale est liée à la membrane par un glycoposphatidylinositol (Smith & Melrose, 2015).

La **substance fondamentale amorphe** est constituée de **mucopolysaccharides**, principalement d'**AH**, et de **GAG sulfatés** associés à un axe protéique formant des **PG** (Figure 29C). Ce gel compressible, permet la **circulation de l'eau** et de **molécules dissoutes**, organisant l'ensemble de la MEC. Elle contient également un réservoir de facteurs de signalisation cellulaire, des glycoprotéines adhésives (fibronectines et laminines) servant à ancrer les cellules à la MEC (Powell, 2006 ; Barbieri *et al.*, 2014).

### 3. Les collagènes

Les collagènes sont les molécules les plus abondantes du règne animal. Les molécules de collagène forment une superfamille, molécules de structure de la MEC (Prost-Squarcioni *et al.*, 2008). Ils représentent 90% des fibres dermiques et 30% du poids total des protéines du corps (Myllyharju & Kivirikko, 2004).



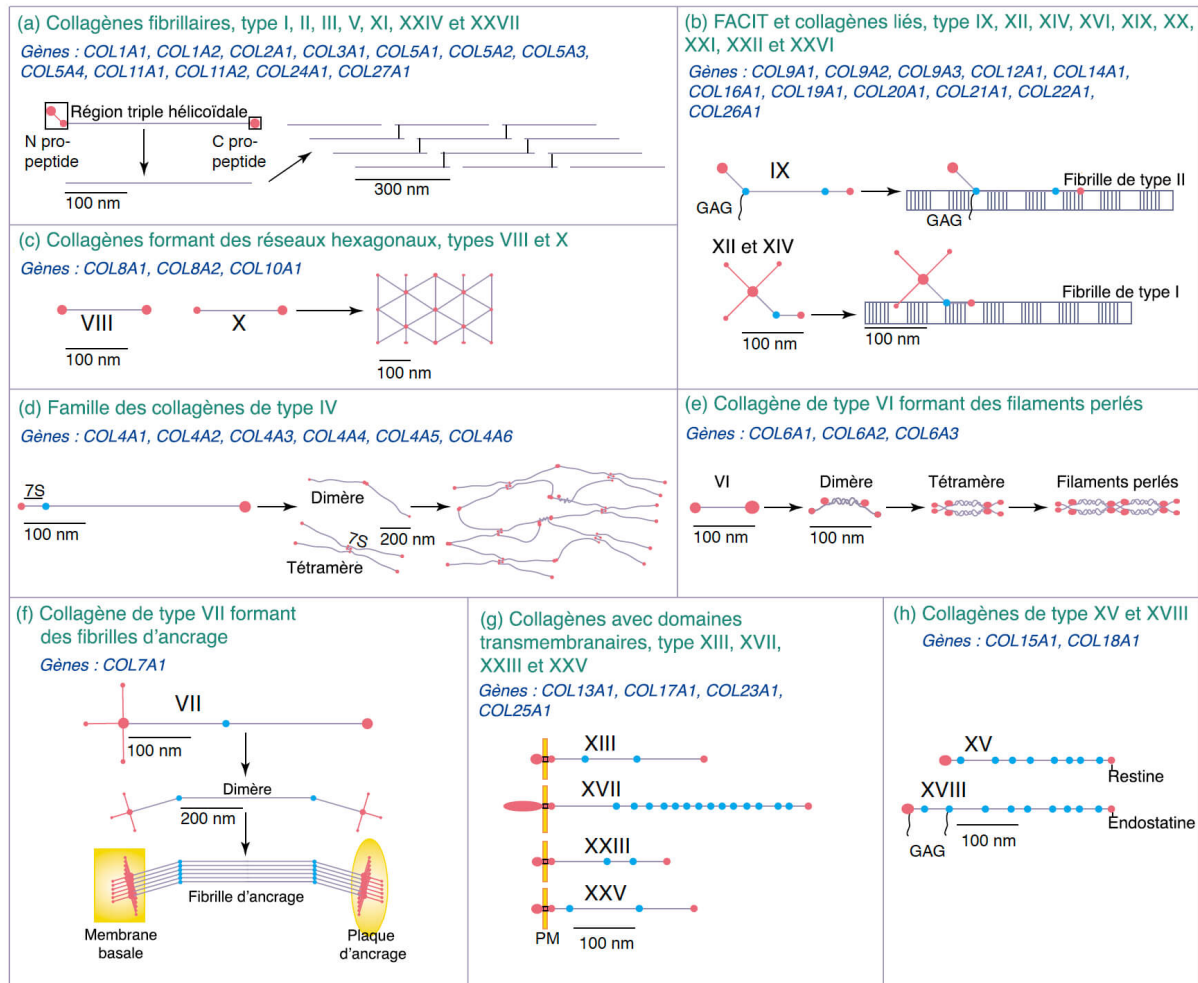
**Figure 30 : Schéma d'une fibrille de collagène illustrant la structure triple hélicoïdale des chaînes  $\alpha$  avec le triplet répété d'acides aminés [Gly-X-Y]**

Glycine (en noir) ; Proline (position X, en rouge) ; Hydroxyproline (position Y, en bleu) ; Liaisons hydrogènes (lignes noires en pointillés) entre les liaisons N-H de la glycine et le carbonyle de la proline du triplet adjacent. Modifié d'après Cole *et al.* (2018).

Le collagène se compose de **3 chaînes polypeptidiques  $\alpha$**  (Figure 30) portant un motif répété de 3 acides aminés : **[Gly-X-Y]** avec Gly la Glycine, X souvent la (2S)-proline (Pro, 28%), et Y la (2S,4R)-4-hydroxyproline (Hyp, 38%). Le triplet **Gly-Pro-Hyp** est le plus commun au niveau du collagène (10,5%). Les collagènes sont donc caractérisés par leurs **chaînes  $\alpha$** , codées par des gènes différents (Shoulders & Raines, 2009).

Vingt-huit collagènes composés d'au moins 46 peptides distincts ont été identifiés chez les vertébrés (Shoulders & Raines, 2009 ; Bou-Gharios *et al.*, 2019).

Deux grandes catégories de collagène sont identifiées en fonction de leur structure et de leur organisation supramoléculaire : les collagènes fibrillaires et les non fibrillaires.



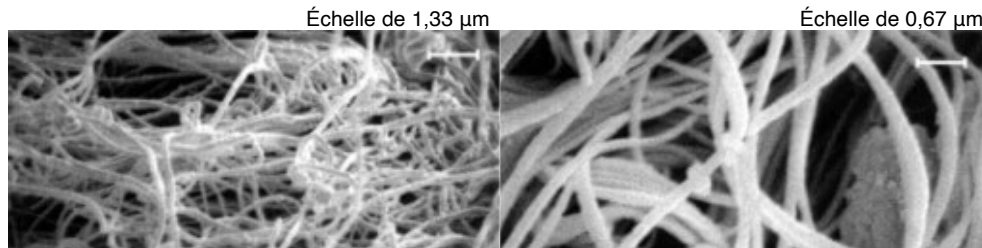
**Figure 31 : Membres de la superfamille des collagènes et leurs assemblages supramoléculaires connus**  
 (a) les collagènes fibrillaires ; (b) les FACIT ; (c) les collagènes formant des réseaux ; (d,f,g) les collagènes intervenant dans les membranes basales ; (e) le collagène de type VI ; (h) les collagènes de types XV et XVIII. Modifié d'après Myllyharju & Kivirikko (2004).

Les **collagènes non fibrillaires** sont caractérisés par des **interruptions de la triple hélice** (Shoulders & Raines, 2009). Ils comprennent :

- Les collagènes **FACIT** (« Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple-helix ») du derme avec principalement les collagènes de type IX, XII, XIV et XVI (Figure 31b).
- Les collagènes pouvant former des **microfibrilles** tels que le collagène de type VI formant un réseau lâche de microfilaments perlés s'accrochant aux fibres de collagènes *via* la décorine, et collagènes de type VII et XVII de la JDE (Figure 31c,e,h).
- Les **collagènes des membranes basales** tels que les collagènes de type IV, XIII, XV et XVIII (Figure 31d,f,g) (Van Der Rest & Garrone, 1991 ; Myllyharju & Kivirikko, 2004).

Les **collagènes fibrillaires** représentent 90% du poids sec de la peau (Barbieri *et al.*, 2014). Les principaux représentants sont les collagènes de type I, II, III, V et XI (Figure 31a). Ils se caractérisent par une longue **triple hélice continue** qui s'auto-assemble dans l'espace extracellulaire en fibrilles et en fibres, hautement organisées et orientées (Bou-Gharios *et al.*, 2019). Les **fibres de collagènes** apparaissent, en microscopie optique, en trousseaux, longs, sinueux et rubanés, d'une longueur indéfinie, et d'un diamètre de 0,5 à 40 µm.

Les trousseaux les plus fins se trouvent au niveau du derme papillaire et les plus épais au niveau du derme réticulaire. En microscopie électronique, la striation transversale observée est due à l'alternance de bandes claires (zones de chevauchement) et de bandes sombres (zones d'espace) suivant une périodicité axiale de 67 nm correspondant au décalage observé dans les fibrilles de collagène (Figure 35, p. 93). Les fibres de collagène sont constituées de fibrilles de diamètre élevé de 75 à 105 nm (Figure 32) assemblées en gros trousseaux denses.



**Figure 32 : Photographies au microscope électronique à balayage de fibrilles de collagènes**  
Modifié d'après Fligel *et al.* (2003)

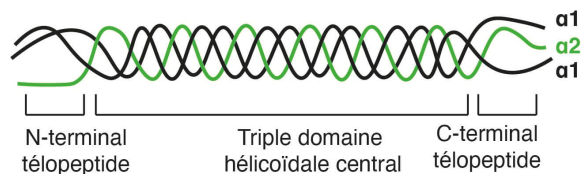
Parmi les collagènes fibrillaires, les **collagènes de type I et III** sont ceux retrouvés majoritairement dans le **derme**. Les fibres de collagène du derme profond contiennent une prédominance de collagène de type I. Le derme papillaire contient majoritairement du collagène de type III organisé en faisceaux minces désorganisés tandis que le derme réticulaire contient principalement du collagène de type I disposé en gros faisceaux épais bien organisés (Meigel *et al.*, 1977 ; Vitellaro-Zuccarello *et al.*, 1992). Lors de la réparation tissulaire, les fibrilles de collagène de type III sont les premières à être déposées avant d'être remplacées par des fibres plus résistantes de collagène de type I (Rangaraj & Harding, 2011).

#### 4. Focus sur le collagène de type I

Dans le derme, le collagène de type I représente 60 à 80% des collagènes (Prost-Squarcioni *et al.*, 2008).

##### a) Structure du collagène de type I

Chaque molécule de collagène de type I, de triple structure hélicoïdale, est formée de trois chaînes  $\alpha$  dont **deux chaînes  $\alpha 1$  et une chaîne  $\alpha 2$**  (ratio stœchiométrique 2 : 1) (Figure 33).



**Figure 33 : Structure du tropocollagène de type I**

Chaque chaîne ( $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ ) consiste en plus de 1000 acides aminés, avec un résidu glycine (Gly) toutes les trois positions du domaine hélicoïdale.

Le tropocollagène de type I, unité fondamentale du collagène, a une taille d'environ 300 nm de long et 1 à 2 nm de large. Il possède trois domaines majeurs (Figure 33) :

- **N-terminal télépeptide** ou **N-télépeptide** : un court peptide N-terminal précédant le long domaine hélicoïdal
- Un **triple domaine hélicoïdal central** long ou **triple hélice** (95% de la molécule)
- **C-terminal télépeptide** ou **C-télépeptide** : un court peptide C-terminal suivant le long domaine hélicoïdal (Shoulders & Raines, 2009 ; Henriksen & Karsdal, 2019).

Les molécules de tropocollagène relativement peu solubles, s'auto-assemblent en **microfibrilles** et sont ensuite réticulées pour former les **fibrilles** et enfin les **fibres de collagène** (Barbieri *et al.*, 2014).

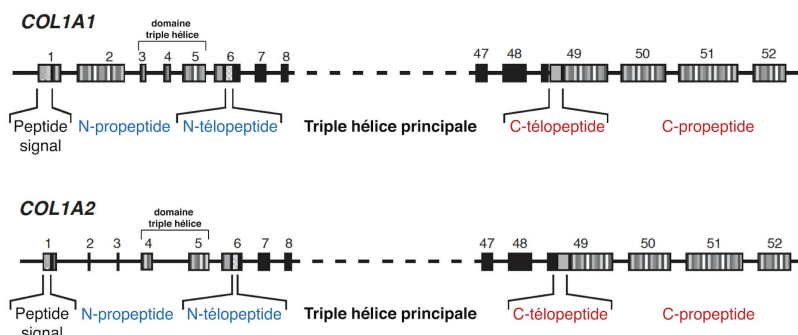
## b) Les gènes du collagène de type I

Les gènes du collagène de type I sont **COL1A1** (localisation sur le long bras du chromosome 17 : 17q21.3-q22) et **COL1A2** (localisation sur le long bras du chromosome 7 : 7q21.2-22.1) codant respectivement pour les deux chaînes  $\alpha 1$  et la chaîne  $\alpha 2$ . Ces deux gènes diffèrent en taille avec 18 kilobase (kb) pour **COL1A1** et 38 kb pour **COL1A2** (Henriksen & Karsdal, 2019).

Ils codent tous deux pour

(Figure 34) :

- Un **peptide signal**
- Un **N-propeptide**
- Un **N-télopeptide**
- Une **triple hélice principale**
- Un **C-télopeptide**
- Un **C-propeptide**.



**Figure 34 : Schéma des gènes COL1A1 et COL1A2 codant pour les chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  du collagène de type I**

Modifié d'après Rossert et de Crombrughe (2002).

Le peptide signal, le N-propeptide et le N-télopeptide des chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  sont codés par les six premiers exons (Figure 34). Le N-propeptide des chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  comporte un domaine globulaire, une courte triple hélice et un court domaine globulaire possédant le site de clivage de la N-protéinase. La différence entre le N-propeptide des deux chaînes réside au niveau du domaine globulaire puisque celui de la chaîne  $\alpha 1$  est riche en cystéine avec 10 motifs cystéine et qu'à l'inverse celui de la chaîne  $\alpha 2$  est court et sans cystéine. Ce propeptide N-terminal interviendrait dans la régulation du diamètre des fibrilles et dans le contrôle du ratio de la transcription des deux chaînes (Bou-Gharios *et al.*, 2019). Les 41 exons (7 à 48) codants pour les motifs Gly-X-Y de la triple hélice, et les deux exons jointifs (6 et 49) codants pour les N- et C-télopeptides et pour une partie des N- et C-propeptides sont similaires en taille pour les chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ . Les quatre derniers exons (49 à 52) codent pour la partie C-terminale c'est-à-dire pour les C-télopeptide et C-propeptide (Rossert & de Crombrughe, 2002).

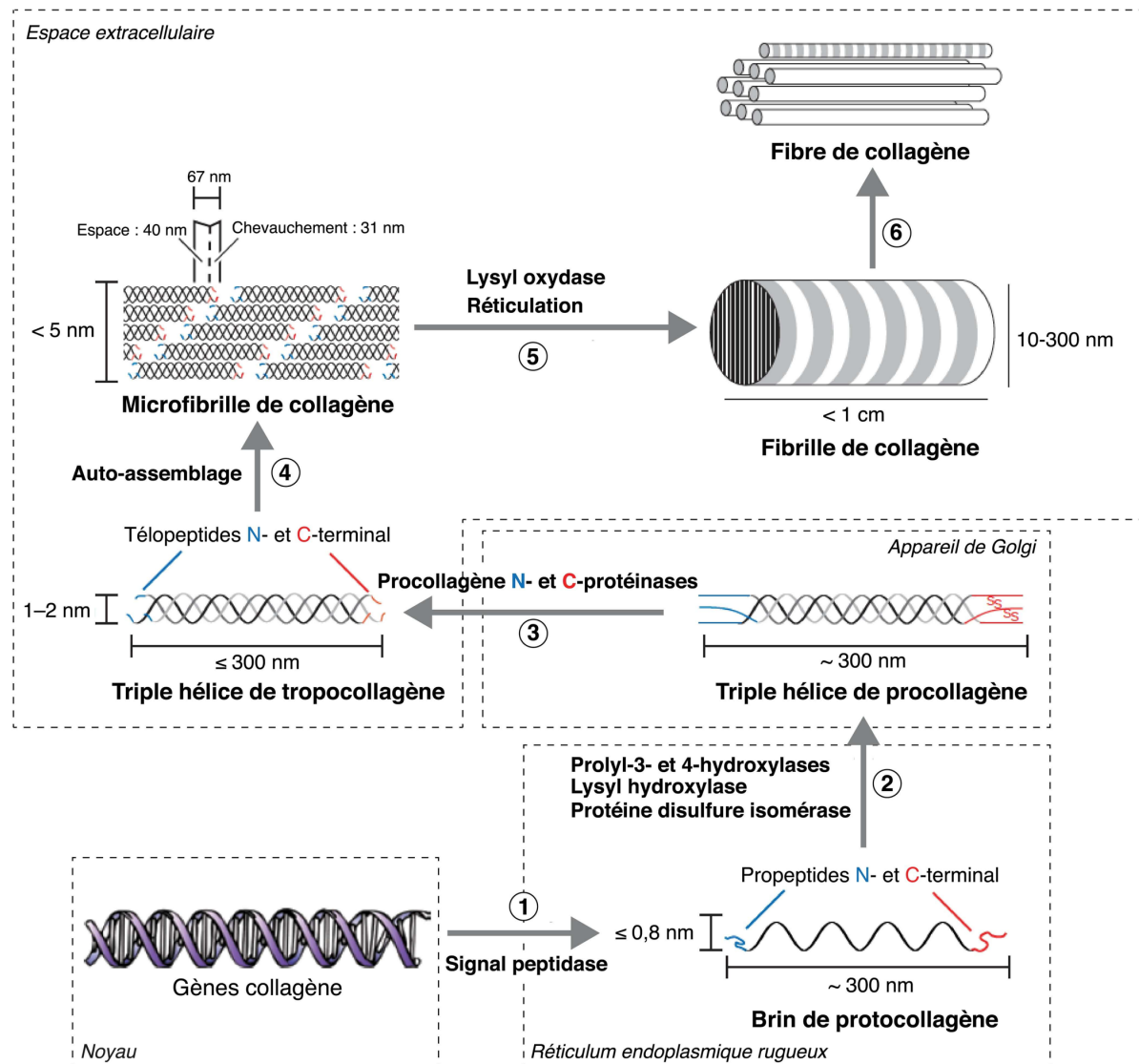
## c) Synthèse du collagène de type I

Après transcription des gènes **COL1A1** et **COL1A2**, les ARN pré-messagers subissent des **modifications post-transcriptionnelles** à savoir l'**épissage des exons**, l'ajout d'une **coiffe en 5'** et l'ajout d'une **queue poly(A) en 3'**. Ces modifications sont essentielles à la stabilité des ARN messagers (ARNm) matures. Pour le collagène de type I, la demi-vie chez l'homme est estimée à 24 heures maximum (Stefanovic, 2013 ; Bou-Gharios *et al.*, 2019).

Les ARNm matures sont ensuite traduits par les ribosomes. Le protocollagène résultant subit d'importantes **modifications post-traductionnelles** dans le milieu intracellulaire, avant d'être assemblé en triple hélice et d'être relargué dans le milieu extracellulaire.



Ces modifications post-traductionnelles sont essentielles pour la correcte fonctionnalisation du collagène de type I et son intégration dans la MEC (Henriksen & Karsdal, 2019).



**Figure 35 : Schéma de la biosynthèse d'une fibre de collagène de type I**  
Modifié d'après Prost-Squarcioni *et al.* (2008) et Shoulders & Raines (2009).

Le **peptide signal** des chaînes est **clivé** par une signal peptidase lorsque leur extrémité N-terminal pénètre dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux (étape ①, Figure 35).

Ensuite, des **hydroxylations des prolines** (100 prolines en position Y et éventuellement en position X du motif Gly-X-Y) par des **prolyl 3- et 4-hydroxylases**, et l'**hydroxylation des lysines** (10 en position Y) par les **lysyl hydroxylases** sont réalisées (étape ②, Figure 35). L'hydroxylation des prolines en hydroxyprolines est indispensable à la formation de la triple hélice par l'intermédiaire des ponts hydrogènes. Les résidus lysines hydroxylés servent ensuite de substrats aux glycosyl- et galactosyl-transférases pour l'ajout de groupements glucose et galactose sur ces lysines (glycosylation). Après l'addition d'oligosaccharides riches en mannose sur les C-propeptides, ces trois propeptides (deux des deux chaînes  $\alpha_1$  et un de la chaîne  $\alpha_2$ ) sont associés par des ponts disulfures intra- et interchaînes *via* la sous-unité **protéine disulfure isomérase** de la **prolyl 4-hydroxylase**.

La triple hélice se forme à l'extrémité C-terminale de la molécule et s'étend vers l'extrémité N-terminale, sous l'action de la peptidyl-prolyl-*cis-trans*-isomérase et des protéines chaperonnes comme la « heat shock protein » 47 qui stabilisent la molécule. La structure globulaire du propeptide C-terminal est stabilisée par des ponts disulfures intrachaînes et contient des résidus cystéines (4 sur la chaîne  $\alpha 1$  et 3 sur l' $\alpha 2$ ) formant des ponts disulfures interchaînes. La formation des ponts disulfures précède la formation de la triple hélice et joue un rôle important dans l'association des trois chaînes  $\alpha$  (Bou-Gharios *et al.*, 2019).

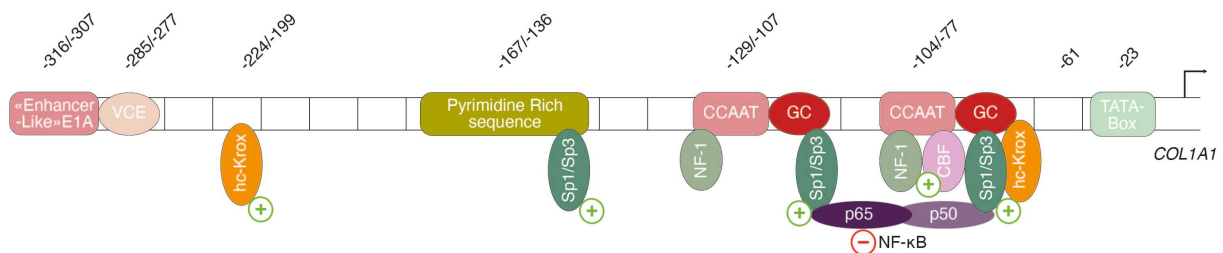
La triple hélice de procollagène est transmise à l'appareil de Golgi puis est excrétée dans l'espace extracellulaire. Les extrémités N- et C-terminales propeptides sont ensuite clivées par les **procollagène N- et C-protéinases** (étape ③, Figure 35).

Après ce clivage, la triple hélice de tropocollagène s'auto-assemble pour former une microfibrille (étape ④, Figure 35). L'assemblage des molécules de tropocollagène se fait latéralement par des liaisons covalentes entre la queue d'une molécule et la tête d'une autre, en laissant un espace dans le sens de la longueur (40 nm) où se logent des substances d'où la striation (Prost-Squarcioni *et al.*, 2008). La réticulation confère sa résistance au collagène (Barbieri *et al.*, 2014). Plus spécifiquement, l'enzyme **lysyl oxydase** catalyse la réticulation des lysines et hydroxylysines entre les hélices individuelles, et aboutit à la formation d'une série de liaisons covalentes intra- et intermoléculaires entre les molécules de collagène (étape ⑤, Figure 35). À l'issue de ce processus les fibrilles de collagène sont formées (Bou-Gharios *et al.*, 2019 ; Henriksen & Karsdal, 2019).

L'assemblage final en fibres de collagène ferait intervenir des petits PG riches en leucine comme la décorine et le biglycane (Galéra *et al.*, 1994 ; Gelse *et al.*, 2003). Dans les fibres, les molécules de collagène sont parallèles les unes aux autres (étape ⑥, Figure 35) (Bou-Gharios *et al.*, 2019).

#### d) Régulation transcriptionnelle du gène *COL1A1*

Le contrôle de l'expression du collagène de type I se fait principalement au niveau transcriptionnel par la co-régulation physiologique des deux gènes *COL1A1* et *COL1A2*. La régulation coordonnée des deux gènes résulte d'une localisation similaire sur les deux promoteurs de plusieurs éléments *cis* régulateurs semblables qui vont lier les mêmes facteurs *trans*, aux activités transcriptionnelles identiques (Karsenty & de Crombrugge, 1991 ; Galéra *et al.*, 1994). Ici est seulement présenté la régulation transcriptionnelle du gène *COL1A1*.



**Figure 36 : Représentation schématique du promoteur proximal du gène *COL1A1* et des facteurs *trans* activateurs et répresseurs**

+ : facteur *trans*activateur, - : facteur *trans*inhibiteur

L'activité transcriptionnelle maximale du gène *in vitro* dépend du promoteur proximal de 174 pb (paires de base) (Jimenez & Saitta, 1999).

Le gène *COL1A1* comporte dans sa région promotrice une boîte TATA (**TATA-box**) située en -23 pb ainsi que deux motifs **CCAAT** en -104/-77 pb et en -129/-107 pb. En amont se situent une **séquence riche en pyrimidines** (-167/-136 pb), un motif **VCE** (« Viral Core Enhancer ») (-285/-277 pb) et un élément « **Enhancer-like** » de l'**adénovirus E1A** (-316/-307 pb) (Figure 36) (Jimenez & Saitta, 1999).

Plusieurs facteurs de transcription interagissent avec des séquences *cis* situées sur le promoteur proximal du gène *COL1A1* afin de réguler la transcription du collagène de type I (Figure 36).

Le facteur **CBF** (« CCAAT Binding Factor ») se lie uniquement en -100/-96 pb sur la boîte CCAAT proximale et non distale, et exerce des effets positifs sur la transcription de *COL1A1* (Saitta *et al.*, 2000).

**Sp1** (« Specific protein 1 ») interagit avec le gène *COL1A1* en se liant sur des séquences en -161/-149 pb et en -122/-115 pb chez des fibroblastes dermiques humains (Saitta *et al.*, 2000). Il permet la régulation positive de l'expression du collagène de type I (Sandorfi *et al.*, 2005 ; Beauchef *et al.*, 2012). **Sp3**, un autre facteur *trans*, peut se fixer sur le promoteur proximal dans la même zone que Sp1 en -174/-50 pb (Saitta *et al.*, 2000) et agir comme un activateur transcriptionnel (Chen *et al.*, 1998 ; Beauchef *et al.*, 2012).

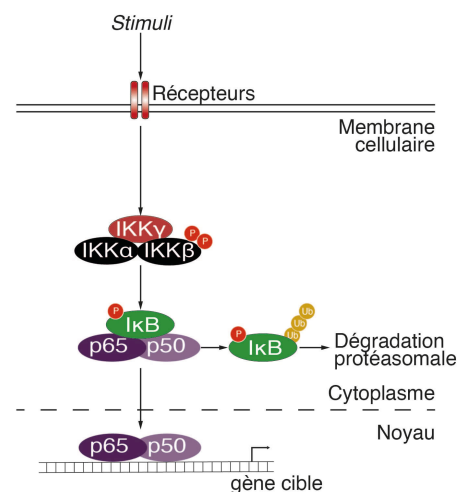
**NF-1** (« Nuclear Factor-1 »), facteur régulant la transcription de *COL1A1*, interagit en tandem avec Sp1 sur la partie proximale du promoteur en -104/-77 pb et sur la partie distale en -129/-107 pb. Toutefois, les auteurs divergent sur ce point (Artlett *et al.*, 1998 ; Saitta *et al.*, 2000).

Le facteur **hc-Krox** (« human collagen-Kruppél box ») interagit en -224/-199 pb et sur séquence comprise entre -112 et -61 pb du promoteur, et active la transcription de *COL1A1* des fibroblastes dermiques humains en culture (Kyriotou *et al.*, 2007).

**NF-κB** (« Nuclear Factor-kappa B ») est un facteur de transcription qui inhibe la transcription du gène *COL1A1* (Rippe *et al.*, 1999 ; Beauchef *et al.*, 2012 ; Bigot *et al.*, 2012).

La famille NF-κB comporte cinq membres, aussi appelés sous-unités, pouvant s'associer entre eux pour former des homo- ou des hétéro-dimères : **p50** (NF-κB1), **p52** (NF-κB2), **p65** (RelA), **c-Rel** et **RelB**.

NF-κB peut être activé par plus d'une centaine d'inducteurs comme les cytokines inflammatoires (IL-1β, TNF-α), les facteurs de croissance (EGF, IGF-1), les produits d'origine bactérienne (LPS : LipoPolySaccharide), les virus, les rayonnements UV, etc. Ces *stimuli* convergent vers l'activation des IKK (« IκB kinase complex », complexe multiprotéique regroupant deux sous-unités : IKKα et IKKβ) qui phosphoryle IκB (« inhibitor of κB ») déclenchant son ubiquitination et sa dégradation protéasomale (Figure 37).



**Figure 37 : Schéma de la voie canonique « classique » de NF-κB**

P : phosphorylation ; Ub : ubiquitination. Modifié d'après Park & Hong (2016).



NF- $\kappa$ B, jusqu'alors inactif et séquestré dans le cytoplasme par I $\kappa$ B, est finalement libéré. Les dimères migrent alors dans le noyau, s'y accumulent et se lient sur les promoteurs et amplificateurs de gènes cibles. NF- $\kappa$ B est largement connu pour initier l'expression de gènes codant pour des cytokines (IL-1, -2, -6 et TNF- $\alpha$ ) (Park & Hong, 2016).

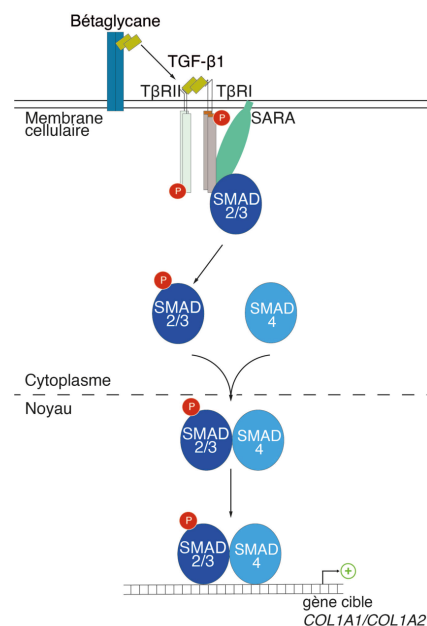
Les sous-unités p65 et p50 sont fortement impliquées dans l'inhibition de la transcription de *COL1A1* via des interactions protéine/protéine avec les facteurs activateurs de la transcription Sp1, Sp3, hc-Krox ou CBF sur le promoteur proximal du gène en -112/-61 pb (Figure 36) (Beauchef *et al.*, 2012 ; Bigot *et al.*, 2012). Par ailleurs, la sous-unité p65 a un effet répresseur plus accentué par rapport à p50 (Rippe *et al.*, 1999).

### e) Cytokines et régulation des gènes du collagène de type I

Par ailleurs, la production de collagène de type I est également régulée au niveau post-transcriptionnel par des **cytokines**. Les cytokines sont des **médiateurs chimiques** sécrétés par des cellules activées qui affectent les autres cellules en se liant aux récepteurs de la surface cellulaire pour moduler l'activité (stimulation ou inhibition de la sécrétion cellulaire, division et migration cellulaire) (Bou-Gharios *et al.*, 2019).

Les molécules de la **superfamille des TGF- $\beta$**  sont des protéines multifonctionnelles régulant la prolifération et la différenciation cellulaire, la modification de la MEC, l'angiogenèse, ou encore l'apoptose. La superfamille est classiquement divisée en deux groupes, les **BMP** (« Bone Morphogenic Protein ») et les **TGF- $\beta$ /activines**. Le TGF- $\beta$  actif est un homodimère de 24 kDa dont les sous-unités avec des séquences riches en cystéines sont liées par des ponts disulfures (Annes *et al.*, 2003). Trois isoformes de TGF- $\beta$  sont recensés chez les mammifères : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3. Le TGF- $\beta$  agit via des récepteurs transmembranaires spécifiques à activité sérine/thréonine kinase : **T $\beta$ RI** (53 kDa) et **T $\beta$ RII** (75 kDa) (Piek *et al.*, 1999).

Les **SMAD** (« S-Mother Against Ddp ») sont des protéines de signal intracellulaires pour le TGF- $\beta$ . Plus précisément, la liaison de TGF- $\beta$  à son récepteur T $\beta$ RII induit un recrutement de T $\beta$ RI qui est alors phosphorylé par T $\beta$ RII. La phosphorylation de T $\beta$ RI provoque un changement de sa conformation et débloque son activité kinase. Ensuite, T $\beta$ RI phosphoryle les ligands spécifiques SMAD2 et SMAD3, qui sont alors libérés de la protéine d'ancrage SARA (« Smad Anchor for Receptor Activation ») (Dijke & Hill, 2004). Ces SMAD vont alors interagir avec leur co-SMAD (SMAD4), former un complexe oligomérique, se transloquer rapidement dans le noyau et se lier à l'ADN du gène cible (Figure 38).



**Figure 38 : Schéma de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  et implication des SMAD**  
Modifié d'après Verrecchia & Mauviel (2004).

Les affinités de liaison des SMAD étant réduites, cela requiert des facteurs *trans* dont Sp1 et Sp3 au niveau du promoteur proximal de *COL1A1*, notamment sur des sites de liaison en -164/-122 pb (Jimenez *et al.*, 1994 ; Chen *et al.*, 1998 ; Gaidarova & Jiménez, 2002), mais aussi comme CBF en -100/-96 pb (Lindahl *et al.*, 2002). Parmi les TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1 est connu pour sa capacité à stimuler la prolifération des fibroblastes, augmenter la production de collagène de type I et inhiber sa dégradation *via* l'inhibition de la synthèse de MMP et l'augmentation de la synthèse de TIMP (Bou-Gharios *et al.*, 2019).

Parmi les cytokines, certaines régulent négativement la transcription du collagène de type I comme le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ .

Le **TNF- $\alpha$**  agit *via* l'intermédiaire des récepteurs TNF-R1 et TNF-R2. Il contrecarre la stimulation de la production du collagène de type I induite par TGF- $\beta$  (Verrecchia & Mauviel, 2004) et augmente la production de **MMP** favorisant la dégradation de la MEC. Le TNF- $\alpha$  supprime l'activité transcriptionnelle au niveau du promoteur de *COL1A1* entre -101/-97 pb et -46/-38 pb (Solis-Herruzo *et al.*, 1988 ; Mori *et al.*, 1996), mais aussi au niveau du promoteur de *COL1A2* (Kouba *et al.*, 1999 ; Greenwel *et al.*, 2000 ; Verrecchia *et al.*, 2002). Le TNF- $\alpha$  provoquerait une augmentation de l'activité de liaison de NF- $\kappa$ B (Rippe *et al.*, 1999) et une activation de l'AP-1 (« Activator Protein-1 ») (Verrecchia *et al.*, 2000).

L'**IFN- $\gamma$**  est une autre cytokine inhibant l'expression des gènes du collagène de type I. Son inhibition met en jeu la région -129/-107 pb du gène *COL1A1* supposant l'implication des facteurs Sp1 et NF-1. Néanmoins, l'IFN- $\gamma$  ne modifie pas l'activité de liaison des protéines nucléaires se liant sur cette séquence, ni l'expression protéique de Sp1/Sp3 mais mettrait en jeu l'IRF-1 (« Interferon Regulated Factor-1 ») (Yuan *et al.*, 1999).

## 5. Les enzymes du catabolisme matriciel et leurs inhibiteurs : remodelage de la MEC

### a) Les MMP

Les MMP sont des **endopeptidases**, appartenant à la famille des **protéases liant le zinc**. Elles sont responsables de la dégradation des constituants de la MEC. Les MMP sont sécrétées par différentes cellules dont les kératinocytes, les **fibroblastes**, les ostéoblastes, les cellules endothéliales, les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes. Les fibroblastes dermiques sont d'importants producteurs de MMP et spécialement de MMP-1, -2, -3 et -14 (Cui *et al.*, 2017). Les MMP sont importantes dans de nombreux processus biologiques, y compris la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire, et le **remodelage de la MEC** (Cui *et al.*, 2017). Les MMP ont aussi un rôle dans la réponse immunitaire *via* le clivage de cytokines, chimiokines, peptides antimicrobiens et protéines de surface cellulaire (Apte & Parks, 2015).

On distingue différentes MMP en fonction de leurs substrats et de l'organisation de leurs domaines structuraux : les **collagénases**, les **gélatinases**, les **stromélysines**, les **matrilysines**, les **MT-MMP** (MMP de type membrane) (Tableau VII).

En général, les MMP sont sécrétées à partir des cellules ou attachées aux membranes plasmiques (MT-MMP) *via* les protéoglycanes riches en héparane sulfate.

**Tableau VII : Classification de métalloprotéinases majoritaires du derme**  
Adapté d'après Cui *et al.* (2017).

Classe	Enzyme	MMP	Substrats de collagène	Substrats de la MEC non collagéniques
Collagénase	Collagénase-1	MMP-1	I, II, III, VII, VIII, X, gélatine	Aggrécane, nidogène, perlecane, partie protéique protéoglycane, serpine, ténascine-C, versicane
	Collagénase-2	MMP-8	I, II, III, V, VII, VIII, X, gélatine	Aggrécane, élastine, fibronectine, laminine, nidogène
	Collagénase-3	MMP-13	I, II, III, IV, gélatine	Aggrécane, fibronectine, laminine, perlecane, ténascine
Gélatinase	Gélatinase A	MMP-2	I, II, III, IV, V, VII, X, XI, gélatine	Aggrécane, élastine, fibronectine, laminine, nidogène, partie protéique protéoglycane, versicane
	Gélatinase B	MMP-9	IV, V, VII, X, XIV, gélatine	
Stromélysine	Stromélysine-1	MMP-3	II, III, IV, IX, X, XI, gélatine	Aggrécane, décorine, élastine, fibronectine, laminine, nidogène, perlecane, protéoglycane, versicane
MT-MMP	MT-1 MMP	MMP-14	I, II, III, gélatine	Aggrécane, élastine, fibrine, fibronectine, laminine, nidogène, perlecane, protéoglycane, tenascin, vitronectine

i. Rôle des MMP

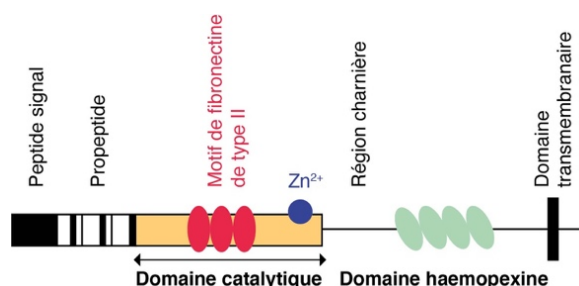
Les MMP jouent un rôle majeur dans le remodelage matriciel *via* la promotion du turnover des protéines de la MEC (collagène, élastine, glycoprotéines, protéoglycanes) (Cui *et al.*, 2017). La dégradation contrôlée de la MEC par les MMP joue un rôle important dans le détachement et la migration des cellules, ainsi que dans le remodelage des tissus dans plusieurs situations physiologiques (morphogénèse tissulaire lors du développement, réparation tissulaire et angiogénèse) (Kähäri & Saarialho-Kere, 1997). En effet, les MMP sont indispensables à la cicatrisation cutanée puisqu'elles éliminent les débris de la plaie, facilitent l'épithélialisation et empêchent le dépôt excessif de collagène au niveau de la cicatrice (Philips *et al.*, 2011). Le collagène et l'élastine sont d'importants substrats pour les MMP. Les fibres de collagène de la peau sont majoritairement dégradées par les MMP-1 et -2, et les fibres d'élastine par des élastases, et les MMP-2 et -9 (Philips *et al.*, 2011). La production et le dépôt de collagène de type I au niveau de la MEC doivent être régulés par le catabolisme matriciel, plus précisément par les MMP-1, afin de maintenir l'homéostasie cutanée.

La MMP-1 (localisation du gène sur le chromosome 11q22.3), aussi nommée collagénase-1 ou collagénase interstitielle, dégrade le collagène et la gélatine (Cui *et al.*, 2017). C'est la seule MMP capable de dégrader une fibrille de collagène intacte. Elle intervient dans le clivage du collagène de type I en fragments de  $\frac{1}{4}$  et  $\frac{3}{4}$  de long. Une fois clivé, de nombreux facteurs dont d'autres MMP peuvent influencer davantage la dégradation séquentielle du collagène (Kammeyer & Luiten, 2015). Les MMP perturbent la triple hélice de collagène, la réticulation et la liaison de surface du collagène à la cellule (Bou-Gharios *et al.*, 2019). Les collagénases MMP-1, -8 et -13 jouent un rôle important dans la dégradation des collagènes de type I et III en fragments de  $\frac{1}{4}$  et  $\frac{3}{4}$  de long en déroulant la triple hélice puis en hydrolysant des liaisons peptidiques. Il y a donc une coopération en parallèle et/ou en cascade entre les différentes MMP pour dégrader complètement un substrat protéique et obtenir une dégradation de la MEC efficace et ciblée. Cette dégradation est également contrôlée par les TIMP (Kähäri & Saarialho-Kere, 1997).

### ii. Structure des MMP

La structure des MMP est caractérisée par (Figure 39) :

- Un **peptide signal N-terminal**, de longueur variable, qui facilite la sécrétion dans l'espace extracellulaire.
- Une séquence de **propeptide** amino-terminal de 80 acides aminés qui permet de maintenir la protéine inactive (pro-MMP).
- Un **domaine catalytique** de 170 acides aminés contenant un motif de liaison à l'ion zinc ( $Zn^{2+}$ ) par trois histidines de la séquence conservée HEXXHXXGXXH. Il se compose de 5 feuillets  $\beta$ , 3 hélices  $\alpha$  et trois ions calcium ( $Ca^{2+}$ ).
- Un **peptide de liaison (région charnière)** de longueur variable (14 à 69 acides aminés).
- Un **domaine haemopexine** de 200 acides aminés qui permet l'interaction des MMP avec les TIMP (Laronha & Caldeira, 2020).
- Un **domaine transmembranaire** additionnel présent que chez certaines MMP (MMP-14, -15, -16 et -24) (Laronha & Caldeira, 2020).



**Figure 39 : Structure d'une MMP**  
Modifié d'après Kähäri & Saarialho-Kere (1997).

Le domaine haemopexine peut être essentiel dans la reconnaissance et la dégradation catalytique du collagène fibrillaire (Kähäri & Saarialho-Kere, 1997 ; Cui *et al.*, 2017).

### iii. Synthèse et activation des MMP

Les MMP sont synthétisées sous forme de pré-pro-MMP et leur peptide signal est éliminé lors de la traduction pour générer les pro-MMP, forme inactive des MMP. Les MMP contiennent un motif « cystéine-switch » PRCGXPD dans lequel le groupe thiol du résidu cystéine chélate le site actif  $Zn^{2+}$  et garde ainsi les MMP sous leur forme zymogène pro-MMP inactive. En effet, le motif « cystéine switch » empêche l'eau d'interagir avec le  $Zn^{2+}$  au niveau du site actif et bloque ainsi l'activité catalytique (Yamamoto *et al.*, 2015). Les pro-MMP sont ensuite activées *via* le clivage du « cystéine switch » par d'autres protéinases, endopeptidases y compris des MMP. Le clivage du « cystéine switch » se répercute sur le poids moléculaire de ces protéines. En effet, le poids moléculaire de la pro-MMP-1 est de 55 kDa tandis que celui de sa forme active est de 45 kDa (Cui *et al.*, 2017).

### iv. Régulation des MMP

Les MMP sont régulées au niveau de l'expression de leurs gènes ou de leur activité cellulaire (**activation** ou **inhibition** par les TIMP) (Philips *et al.*, 2011). En effet, les MMP peuvent être régulées par différentes **cytokines**. Dans les fibroblastes, les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 induisent l'activation de la voie des MAPK (« Mitogen-Activated Protein Kinases ») (Brauchle *et al.*, 2000) avec le facteur de transcription AP-1 (Benbow & Brinckerhoff, 1997) ou de la voie NF- $\kappa$ B (Barchowsky *et al.*, 2000), aboutissant à une augmentation de l'expression des MMP et à une

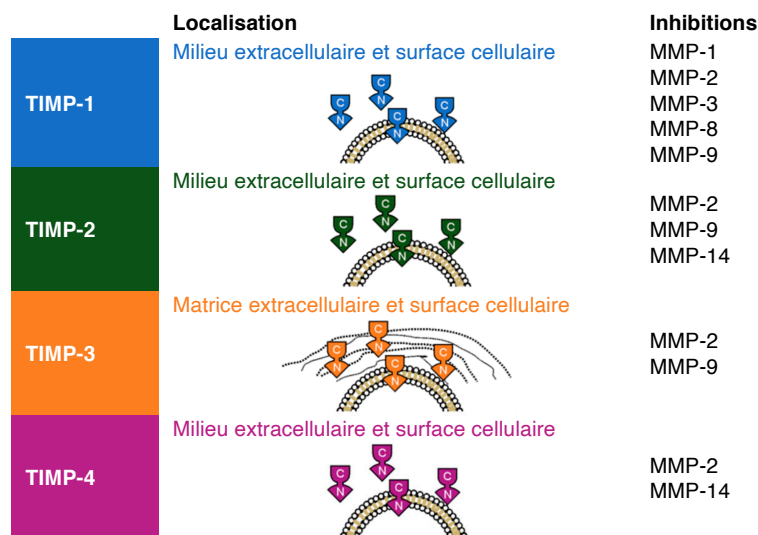
stimulation de leur synthèse (Yan & Boyd, 2007). *A contrario*, le TGF-β1 induit une inhibition des MMP (Edwards *et al.*, 1987 ; Mauviel *et al.*, 1996).

Au niveau de la MEC, les MMP sont **liées** sous forme latente ou activée à des **TIMP** qui régulent leur activité (Baker *et al.*, 2002). Les TIMP sont essentiels pour la formation de complexes non inhibiteurs pro-MMP/TIMP/MT-MMP.

### b) Les TIMP

Un équilibre et un couplage entre la synthèse des composants de la MEC, des MMP et des TIMP permettent le renouvellement et le remodelage de cette MEC (Prost-Squarcioni *et al.*, 2008).

Les TIMP sont des **inhibiteurs de MMP** endogènes d'origine naturelle qui se lient aux MMP dans une stœchiométrie 1 : 1. Quatre homologues de TIMP ont été identifiés : **TIMP-1, -2, -3 et -4** (Figure 40). L'une des caractéristiques importantes des TIMP est la présence de **12 résidus cystéine** formant des **liaisons disulfures intramoléculaires** repliant les protéines en deux domaines (trois boucles dans chaque domaine) : un **grand domaine N-terminal** (126 acides aminés dans le cas de TIMP-1 contenant le site d'inhibition des MMP) et un **petit domaine C-terminal** (Hayakawa & Yamashita, 2003). Les 22 premiers acides aminés du domaine N-terminal des TIMP sont des composants clés pour l'activité d'inhibition des MMP (Laronha *et al.*, 2020). Les TIMP-1 et -3 sont des glycoprotéines, tandis que les TIMP-2 et -4 ne contiennent pas de glucide. Les TIMP ont une **faible spécificité** pour une MMP donnée, et chaque TIMP peut inhiber plusieurs MMP avec des efficacités différentes (Figure 40). Le **TIMP-1** (28,5 kDa), le plus courant, inhibe l'ensemble des MMP sauf MMP-14 (MT-1 MMP), et est l'inhibiteur le plus efficace de la MMP-1 (Cui *et al.*, 2017).



**Figure 40 : Localisation des TIMP et interactions avec les MMP majoritaires du derme**  
N : domaine N-terminal ; C : domaine C-terminal. Modifié d'après Cabral-Pacheco *et al.* (2020).

Les MMP et leur inhibiteurs TIMP régulent finement le maintien de l'homéostasie dermique grâce à cette balance entre anabolisme et catabolisme matriciel. Une perturbation de cette balance (collagène/MMP/TIMP) peut entraîner, soit des fibroses attestant d'une activité anabolique prépondérante ou, au contraire, à un vieillissement précoce de la peau attestant d'une activité catabolique prépondérante.

## C. La modulation du système cutané

Le système cutané peut subir des altérations comme la cicatrisation cutanée et la sclérodermie, mais aussi des évolutions comme le vieillissement cutané.

### 1. La cicatrisation cutanée

La cicatrisation cutanée est un processus biologique complexe participant au rétablissement de l'intégrité et de l'homéostasie cutanée suite à une blessure. Différents types cellulaires (cellules cutanées résidentes, cellules endothéliales, cellules sanguines et cellules immunitaires), des médiateurs solubles (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance) et la MEC participent au processus de cicatrisation des plaies (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019).

Le processus de réparation tissulaire est alors organisé en quatre étapes séquentielles, se chevauchant : ① l'**hémato**se ou coagulation, ② l'**in**flammation, ③ la **prolifération**, et ④ le **remodelage** (Figure 41) (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019 ; Wilkinson & Hardman, 2020). Parfois la phase inflammatoire comprend l'hémato

se et l'inflammation neurogène cutanée. On distingue deux types de plaies : les **plaies superficielles** atteignant seulement la zone épidermique et les **plaies profondes** atteignant l'intégrité du derme.

La cicatrisation des plaies superficielles repose sur un processus de réparation simple faisant intervenir une migration de kératinocytes dans la zone lésée. La cicatrisation des plaies profondes repose sur un processus de réparation complexe faisant intervenir différents types cellulaires dont les fibroblastes.

#### a) L'hémato

se ou coagulation L'étape d'hémato

se commence immédiatement après la blessure tandis que l'inflammation commence dans les jours qui suivent. Après la blessure, les vaisseaux sanguins endommagés se contractent rapidement et un **caillot sanguin** ou bouchon plaquette se forme, empêchant l'exsanguination. Par ailleurs, une **matrice préliminaire** riche en **fibrine** se forme afin de colmater la plaie, prévenir les saignements et protéger contre une infection bactérienne (étape ①, Figure 41). Les plaquettes ont un rôle fondamental dans le recrutement ultérieur des cellules immunitaires vers le site de la lésion (Golebiewska & Poole, 2015) mais également dans la stimulation des fibroblastes et kératinocytes (Xian *et al.*, 2015). Une fois le caillot formé, le processus de coagulation est interrompu (Wilkinson & Hardman, 2020).

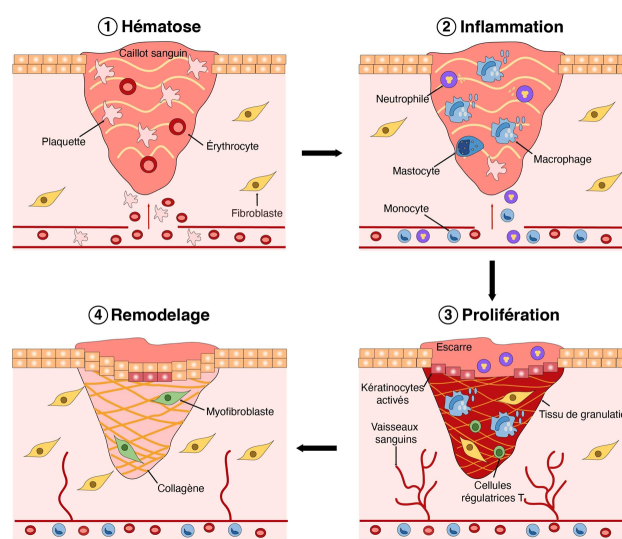


Figure 41 : Étapes de la cicatrisation cutanée  
Modifié d'après Wilkinson & Hardman (2020).



## b) La phase inflammatoire

La réponse inflammatoire est complexe et fait intervenir de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques. Différents types cellulaires sont impliqués dans cette phase : les neutrophiles, les mastocytes, les macrophages et les cellules T résidentes (étape ②, Figure 41) (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019).

L'inflammation a pour but d'**éliminer les débris** et de **prévenir l'infection** par des agents pathogènes externes. Pour cela, en réponse à des signaux pro-inflammatoires et à l'activation de voies de signalisation inflammatoires, les **neutrophiles** affluent au niveau de la plaie, et éliminent les débris cellulaires et les agents pathogènes *via* la phagocytose, la libération de ROS, de peptides antimicrobiens, etc (Brinkmann *et al.*, 2004 ; Segel *et al.*, 2011 ; Kolaczowska & Kubes, 2013). Les monocytes arrivent plus tardivement et se différencient en **macrophages** tissulaires afin d'éliminer les débris cellulaires et neutrophiles restants (Delavary *et al.*, 2011).

## c) La phase migratoire et proliférative

La phase proliférative de la cicatrisation est caractérisée par une activation importante des kératinocytes, fibroblastes, macrophages et cellules endothéliales afin d'orchestrer la fermeture de la plaie, le dépôt de matrice et l'angiogenèse (étape ③, Figure 41) (Wilkinson & Hardman, 2020).

Durant la phase proliférative, les kératinocytes sont donc activés par des changements de tension mécanique et des gradients électriques, par exposition aux facteurs de croissance et aux cytokines (Rousselle *et al.*, 2019).

Ils migrent alors aux bords de la plaie, subissent une transition partielle épithéliale-mésenchymateuse et développent un phénotype plus invasif et migrateur (Abba *et al.*, 2016 ; Haensel & Dai, 2018). Les kératinocytes du bord de la plaie peuvent migrer latéralement à travers la plaie, suite à un changement de polarité, afin de reformer la couche épidermique *via* un processus de **ré-épithélialisation** et donc fermer l'espace de la plaie (Sivamani *et al.*, 2007). Les kératinocytes dans le néo-épiderme libèrent des MMP (principalement MMP-1 et -9) et d'autres protéases comme le plasminogène pour faciliter leur migration *via* la dissolution des hémidesmosomes des kératinocytes épidermiques basaux (Caley *et al.*, 2015). Les kératinocytes expriment alors de nouvelles intégrines :  $\alpha 5\beta 1$  récepteur à la fibronectine,  $\alpha v\beta 6$  récepteur à la ténascine,  $\alpha v\beta 5$  récepteur à la vitronectine, et  $\alpha 2\beta 1$  récepteur collagénique. Ces intégrines permettent alors les interactions des kératinocytes avec les protéines structurales de la matrice provisoire de la plaie ou du derme sous-jacent à cette matrice, ce qui permet alors leur migration (Sivamani *et al.*, 2007 ; Caley *et al.*, 2015).

En parallèle de leur migration, les kératinocytes déposent de nouvelles protéines de la MEC permettant de reconstituer la membrane basale (Rousselle *et al.*, 2019). Lorsque les kératinocytes des bords opposés se rencontrent, la migration se termine. Une fine couche épithéliale se forme et les kératinocytes établissent de nouvelles adhérences à la matrice sous-jacente. Finalement, ils reforment complètement la membrane basale, et subissent une différenciation terminale pour stratifier et régénérer l'épiderme (Wilkinson & Hardman, 2020).

Les fibroblastes sont les principales cellules responsables du remplacement de la matrice provisoire initiale, riche en fibrine, par un **tissu de granulation** *via* la synthèse de fibres de collagène et autres composants de la MEC (PG, GAG et glycoprotéines). Le tissu de granulation comporte majoritairement du collagène de type III (approximativement 30%) et seulement 10% de collagène de type I (Witte & Barbul, 1997).

Sous l'influence de gradients chimiotactiques de cytokines et facteurs de croissance dont le PDGF (« Platelet Derived Growth Factor »), le FGF (« Fibroblast Growth Factor ») et le TGF- $\beta$ 1, les fibroblastes migrent de façon centripète, des bordures vers le centre de la plaie (Grazul-Bilska *et al.*, 2003 ; Olczyk *et al.*, 2014). La migration des fibroblastes est majoritairement médiée par **liaison à la fibronectine** *via* les intégrines  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 et  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 plutôt que par liaison au collagène *via*  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (Xu & Clark, 1996). Les fibroblastes, au cours de la formation du tissu de granulation peuvent se différencier en **myofibroblastes**, caractérisés par l'expression d' $\alpha$ -SMA (« alpha-Smooth Muscle Actin ») conférant aux cellules la propriété de se contracter (Sarrazy *et al.*, 2011). La migration de ces myofibroblastes est médiée par liaison à la fibrine *via* l'intégrine  $\alpha$ v $\beta$ 5 (Gaillit *et al.*, 1997). Une fois sur le site de la plaie, les fibroblastes réduisent leur activité migratoire, prolifèrent, dégradent le caillot de fibrine *via* la production de diverses MMP, et le remplacent par des composants de la MEC comme les collagènes de type I et III, les glycoprotéines, les PG et les GAG (Bainbridge, 2013 ; Olczyk *et al.*, 2014).

Cette MEC complexe soutient et régule la migration et l'activité des fibroblastes, et agit comme un support et un signal pour l'angiogenèse (Bainbridge, 2013). De nouveaux vaisseaux sanguins se reforment par angiogenèse, processus déclenché par l'hypoxie, *via* la prolifération et la migration de cellules endothéliales microvasculaires qui fusionnent (Honnegowda *et al.*, 2015). Les macrophages et les cellules régulatrices T, ou lymphocytes T (LT) régulateurs, sont indispensables à cette étape d'angiogenèse. Les LT régulateurs ont un rôle direct *via* la régulation positive de niveaux de facteurs chimiotactiques ou indirect *via* leurs effets sur les macrophages. En effet, les macrophages facilitent la migration des cellules endothéliales *via* la production de protéases comme les MMP qui permettent de dégrader le réseau fibreux dense et *via* la sécrétion de facteurs chimiotactiques (Wilkinson & Hardman, 2020).

### d) La phase de remodelage tissulaire

Le remodelage est la dernière étape de la cicatrisation cutanée. La MEC déposée est encore remodelée par les fibroblastes. Par l'action des MMP, relarguées par les fibroblastes, le collagène de type III du tissu de granulation est dégradé et remplacé au fur et à mesure par du collagène de type I. Le collagène de type I est réorganisé en fibrilles parallèles, augmentant directement la résistance à la traction de la cicatrice en formation (Olczyk *et al.*, 2014 ; Maquart & Monboisse, 2014). Les MMP et TIMP synthétisés par les fibroblastes permettent ainsi la réorganisation de la matrice et son homéostasie (Sarrazy *et al.*, 2011).

Les vaisseaux sanguins régressent et les myofibroblastes provoquent une **contraction globale de la plaie** (étape ④, Figure 41) (Wilkinson & Hardman, 2020). Lors de la phase de remodelage, les myofibroblastes deviennent la population cellulaire la plus importante dans le tissu de granulation.



Les intégrines  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 1$  des fibroblastes réagissent avec le collagène et interviennent dans la contraction du tissu de granulation (Desmoulière *et al.*, 2005 ; Sarrazy *et al.*, 2011). Lorsque la MEC de la nouvelle plaie a une **résistance à la traction similaire** à celle du tissu environnant, le nombre total de fibroblastes (myofibroblastes et fibroblastes) diminue *via* l'apoptose, déclenchant l'évolution du tissu de granulation en tissu cicatriciel (Bainbridge, 2013).

## 2. La sclérodermie

Le terme de sclérodermie regroupe plusieurs affections de causes diverses ayant en commun une **induration scléreuse** de la peau c'est-à-dire une lésion caractérisée par une surproduction quantitative de collagène et autres composants matriciels, qualitativement normale.

### a) Deux types de sclérodermie

Deux types de sclérodermies sont définies selon la localisation et la gravité de la pathologie : la **Sclérodermie Localisée** (LoS), exclusivement cutanée, et la **Sclérodermie Systémique** (ScS), plus grave, associant des atteintes cutanée et vasculaire.

La LoS est donc une forme cutanée pure, ne présentant aucun phénomène de Raynaud, ou de formation d'auto-anticorps. Les formes de LoS sont généralement appelées « **Morphées** ». Les Morphées sont localisées en **plaques**, localisées en **bandes** ou **linéaires**, localisées en **gouttes**, ou **généralisées** (Figueiroa Careta & Romiti, 2015).

La ScS est une pathologie complexe et hétérogène, caractérisée par :

- Une **atteinte vasculaire** souvent sous forme de lésion de l'épithélium.
- Une **inflammation** avec des infiltrations dans les tissus conjonctifs de monocytes, lymphocytes et macrophages localisés au niveau des vaisseaux sanguins.
- Une **fibrose** caractérisée par un dépôt excessif de composants matriciels détruisant l'architecture des tissus et le fonctionnement des organes atteints (Denton & Black, 2005 ; Gabrielli *et al.*, 2009).

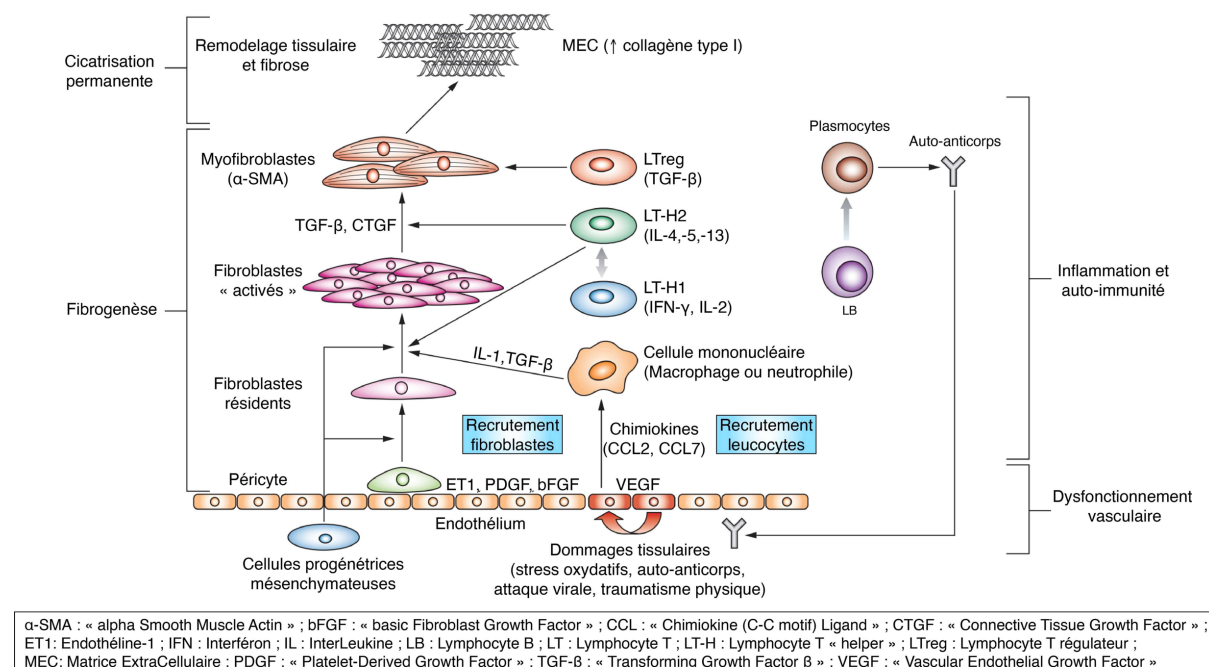
### b) Différents types cellulaires impliqués

La pathogénèse de la sclérodermie est complexe et fait intervenir différents types cellulaires dans la maladie. Les cellules du système immunitaire notamment les **lymphocytes T** (LT) et **lymphocytes B** (LB), les **cellules endothéliales** et les **fibroblastes** ou **myofibroblastes** recrutés à partir de différentes sources (fibrocytes, cellules souches de moëlle osseuse, fibroblastes tissulaires) (Figure 42) (Sierra-Sepúlveda *et al.*, 2019).

La perturbation de l'architecture des tissus est due à la fibrose suite à la synthèse excessive de protéines de la MEC dont le collagène de type I par les fibroblastes (Denton *et al.*, 2006). L'**activation des fibroblastes** résidents est au cœur du développement de la progression de la fibrose (Figure 42). En effet, comme dans la cicatrisation des plaies, la fibrose est provoquée par l'activation des fibroblastes, la prolifération et la migration des cellules dans le site du traumatisme, et le dépôt de protéines matricielles comme la fibronectine et le collagène de type I (Leask & Abraham, 2004).

Toutefois, à l'inverse de la cicatrisation, les myofibroblastes persistent, s'accumulent dans les tissus conjonctifs, et favorisent un microenvironnement profibrotique riche en MEC et en facteurs de croissance (Figure 42) (Gilbane *et al.*, 2013).

Les fibroblastes tissulaires résidents répondent ainsi de manière excessive aux cytokines et facteurs de croissance des différents acteurs cellulaires, aboutissant à l'excès de fibrose cutanée tissulaire (Figure 42) (Denton *et al.*, 2006).



**Figure 42 : Schéma de la pathogénèse complexe de la sclérodémie systémique**  
Modifié d'après Denton *et al.* (2006).

### c) TGF-β/SMAD et sclérodémie

Le TGF-β, cytokine pro-fibrosante, favorise notamment la synthèse des collagènes fibrillaires et fibronectine, et inhibe les enzymes dégradant la MEC comme les MMP. Dans la pathogénèse de la sclérodémie, le TGF-β joue un rôle central. Il a été montré qu'il n'y avait pas de différence significative de la production de TGF-β1 total et actif entre les fibroblastes sclérodermiques et les fibroblastes normaux (Ihn *et al.*, 2001), mais une augmentation de l'expression des **récepteurs du TGF-β** (TβRI et TβRII) (Kawakami *et al.*, 1998 ; Roulot *et al.*, 1999 ; Ihn *et al.*, 2001 ; Kubo *et al.*, 2001, 2002 ; Yamane *et al.*, 2002) en réponse à l'exposition à diverses cytokines comme le TGF-β, le PDGF et l'EGF (« Endothelial Growth Factor ») (Figure 42) (Ihn, 2008).

D'autres études ont montré l'augmentation de l'expression de SMAD3 et la phosphorylation de **SMAD2/3** (Mori *et al.*, 2003), ainsi qu'une diminution de l'expression de SMAD7 dans des fibroblastes sclérodermiques (Dong *et al.*, 2002). En plus d'un rôle direct *via* l'induction de l'accumulation de matrice, il a été montré que le TGF-β1 pourrait jouer un rôle indirect en induisant une résistance des fibroblastes sclérodermiques à l'apoptose et à leur différenciation en myofibroblastes (Jelaska & Korn, 2000). Le TGF-β induit également la libération de **CTGF** (« Connective Tissue Growth Factor ») par les fibroblastes (Leask *et al.*, 2001) aboutissant à la surproduction de collagène de type I (Figure 42) (Yan *et al.*, 2007) et donc au maintien du phénomène fibrotique de la maladie (Denton & Abraham, 2001).

### 3. Le vieillissement cutané

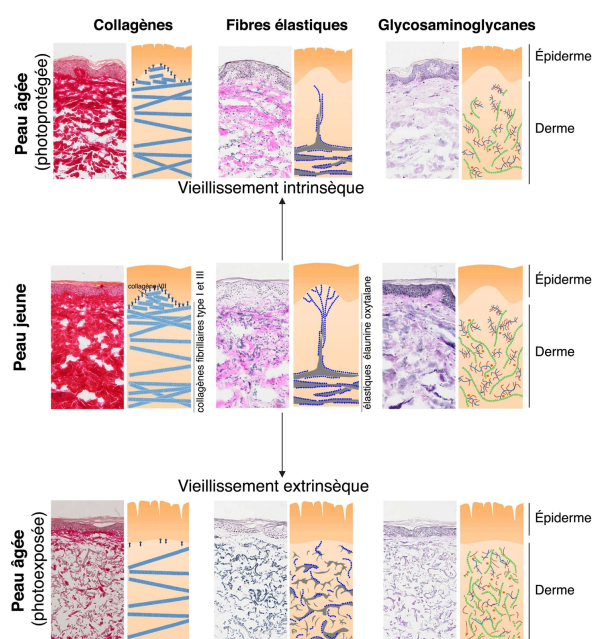
Le vieillissement cutané est un processus complexe, lent, graduel, associé à des changements d'apparence, de caractéristiques et de fonctions de la peau (Singh *et al.*, 2019). Il est lié à des causes **intrinsèques** et **extrinsèques** sous l'influence de facteurs environnementaux (Kammeyer & Luiten, 2015 ; Kim & Park, 2016 ; Singh *et al.*, 2019 ; Haydont *et al.*, 2019). Les processus de vieillissement cutané s'accompagnent de changements phénotypiques au niveau des cellules cutanées ainsi que de changements structurels et fonctionnels dans les composants de la MEC (Zhang & Duan, 2018). Les rides et le relâchement cutané sont les deux principaux signes cliniques visibles du vieillissement cutané (Haydont *et al.*, 2019).

Les modifications majeures des composants de l'épiderme et du derme lors du vieillissement intrinsèque et extrinsèque sont récapitulées dans le Tableau VIII et sur la Figure 43 (Naylor *et al.*, 2011).

**Tableau VIII : Modifications majeures des composants de l'épiderme et du derme avec le vieillissement intrinsèque et extrinsèque**

		Vieillissement	
		Intrinsèque	Extrinsèque
<b>Composants de l'épiderme</b>			
<b>Épiderme</b>	Épaisseur	↓	↑
	Renouvellement	↓	
<b>Composants du derme</b>			
<b>Fibroblastes</b>	Prolifération	↓	↓
	MEC Production	↓	↓
<b>Matrice dermique</b>	Épaisseur	↓	↓
	Rigidité	↑	↑
	Fibres de collagène	↓	↓
	Fibres élastique	↓	↑
	MMP	↑	↑
	TIMP		↓
	GAG	↓	↑
Désorganisation structurale	↑	↑	

↑ : augmentation ; ↓ : diminution. Modifié d'après Tang (2017).



**Figure 43 : Remodelage de la MEC dermique lié au vieillissement intrinsèque et extrinsèque (peau photoexposée)**  
Modifié d'après Naylor *et al.* (2011).

#### a) Le vieillissement intrinsèque

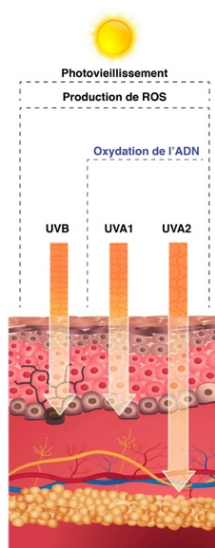
Le vieillissement cutané intrinsèque résulte du passage du temps et est influencé par des facteurs génétiques. Les principaux signes cliniques du vieillissement intrinsèque sont l'amincissement de la peau, notamment de l'épiderme, mais aussi une perte d'élasticité et l'apparition de rides fines (Kammeyer & Luiten, 2015). Ceci est dû à une diminution du renouvellement cellulaire en raison de cycles cellulaires prolongés, à une diminution de la qualité de différenciation des kératinocytes, à une perte de motilité des fibroblastes de la MEC (Bonifant & Holloway, 2019), et à un retard dans la desquamation de la peau. On parle de sénescence répliquative ou sénescence cellulaire de la peau, correspondant au processus de diminution de la capacité de prolifération et de réplication des kératinocytes et fibroblastes (Campisi, 1998). Ainsi, l'accumulation de cellules sénescents, ne subissant pas d'apoptose, augmente avec l'âge et altère le rôle du système cutané.

Avec l'âge, il y a également un ralentissement de la biosynthèse des composants de la MEC (collagènes de type I et III, élastine, GAG et PG) et une augmentation de leur dégradation *via* l'augmentation de la teneur en MMP qui n'est pas contrebalancée par une augmentation correspondante des TIMP (Lovell *et al.*, 1987 ; Burke *et al.*, 1994 ; Vuillermoz *et al.*, 2005). Ce déséquilibre entre MMP et TIMP accélère la fragmentation progressive du collagène dans le derme et accélère le vieillissement cutané (Kim & Park, 2016 ; Singh *et al.*, 2019 ; Haydont *et al.*, 2019). Aussi, l'expression des enzymes lysyl oxydases et lysyl oxydases-like diminue avec l'âge et entraîne une réduction de l'assemblage de nouvelles fibres élastiques qui sont alors désorganisées, raccourcies et fragmentées (Kim & Park, 2016).

### b) Le vieillissement extrinsèque

Le vieillissement extrinsèque de la peau est défini comme un processus augmenté de dégradation de l'intégrité structurelle et de la fonctionnalité de la peau lors d'une exposition à des facteurs environnementaux comme le stress, l'exposition chronique au soleil, le tabagisme, la pollution de l'air et l'alimentation. Les facteurs du vieillissement extrinsèque se combinent à ceux du vieillissement intrinsèque (Kammeyer & Luiten, 2015). Il est phénotypiquement différent du vieillissement intrinsèque et se caractérise par des rides grossières profondes, une perte d'élasticité, un changement de pigmentation et un teint irrégulier (Kammeyer & Luiten, 2015 ; Lee *et al.*, 2020).

L'exposition aux UV est le premier facteur de vieillissement extrinsèque et compte pour 80% du vieillissement facial (Zhang & Duan, 2018). Le photovieillissement affecte les trois couches de la peau (épiderme, derme et hypoderme) et résulte principalement d'une exposition quotidienne à de faibles doses d'UV qui entraînent des changements biologiques. Les UVB (290-320 nm) et surtout les UVA (320-400 nm), en ciblant la matrice dermique, contribuent au photovieillissement (Krutmann *et al.*, 2017) (Figure 44).



**Figure 44 : Schéma de la pénétration des UV dans la peau, source de photovieillissement**  
Modifié d'après Krutmann *et al.* (2017).

Les UV augmentent l'altération de la différenciation des kératinocytes épidermiques et affectent de différentes façons les composants de la MEC. Contrairement au vieillissement intrinsèque, le photovieillissement se caractérise par une accumulation de fibres élastiques amorphes, épaissies, fragmentées, désorganisées mais essentiellement non fonctionnelles dans tout le derme. Ce processus est appelé « élastose solaire ». Par ailleurs, les teneurs en AH et en GAG sulfatés totaux sont augmentées, plus particulièrement dans les régions d'élastose solaire où ils sont anormalement déposés (Bernstein & Uitto, 1996 ; Bernstein *et al.*, 1996).

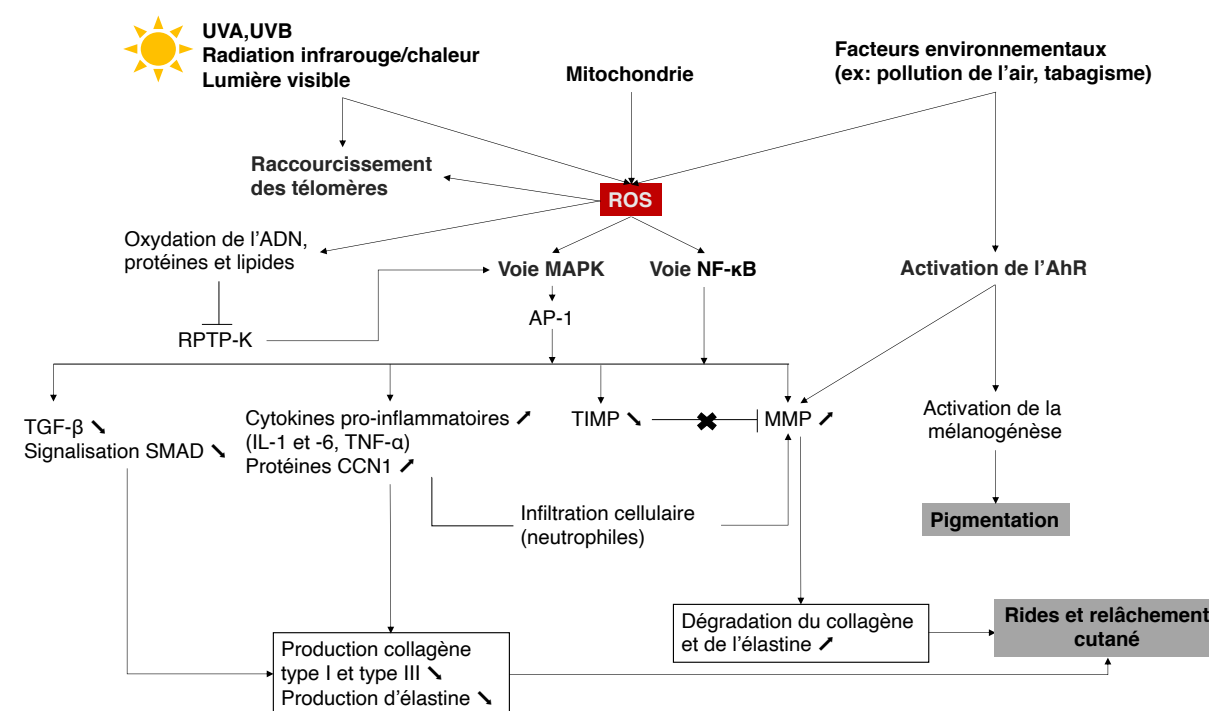
Les UV contribuent à la dégradation des collagènes de type I et III (Talwar *et al.*, 1995), mais aussi du collagène de type VII de la JDE (Kon *et al.*, 2005). En plus de la production de MMP par les fibroblastes, les UV induisent leur production par les kératinocytes (Onoue *et al.*, 2003 ; Dong *et al.*, 2008).

Les UV entraînent la production de ROS, produits secondaires dans la chaîne de transport d'électrons des mitochondries du métabolisme cellulaire aérobie, principalement des fibroblastes et kératinocytes (Pillai *et al.*, 2005). Une exposition persistante de la peau aux rayons UV augmente les dommages, les **mutations** de l'ADN, c'est-à-dire des défauts des brins d'ADN, entraînant un vieillissement prématuré (Zhang & Duan, 2018). L'accumulation de mutations non réparées de l'ADN peut ainsi provoquer l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Kammeyer & Luiten, 2015).

D'autres facteurs environnementaux comme la pollution de l'air ou le tabagisme contribuent à l'altération de la croissance et de la prolifération des fibroblastes conduisant à des similitudes avec les fibroblastes sénescents, et entraînent une augmentation de la production de ROS et de MMP-1 médiée par la voie AhR (« Arylhydrocarbon Receptor ») dans la peau humaine (Kim & Park, 2016 ; Krutmann *et al.*, 2017).

### c) Mécanismes moléculaires principaux du vieillissement cutané

Les mécanismes moléculaires du vieillissement cutané mettent en jeu le raccourcissement des télomères, des cytokines et protéines, et surtout les ROS qui activent différentes voies de signalisation cellulaires (Figure 45).



**Figure 45 : Représentation schématique de la pathogenèse du vieillissement cutané intrinsèque et extrinsèque**

AP-1: « Activator Protein-1 »; NF-κB: « Nuclear Factor-kappa B »; AhR : « Arylhydrocarbon Receptor » ; SMAD : « S-Mother Against Ddp »; RPTP-κ : « Receptor Type Protein-Tyrosinase Phosphatase κ » ; TIMP : « Tissue Inhibitors of MetalloProteinases »; MMP : Métalloprotéinases Matricielles ; TGF-β : « Transforming Growth Factor-β »; IL : InterLeukine ; TNF-α : « Tumor Necrosis Factor α »; CCN1: « Cysteine-rich angiogenic protein 61 ». Modifié d'après Kammeyer & Luiten (2015) et Kim & Park (2016).

- Raccourcissement des télomères

La sénescence cellulaire impliquant le **raccourcissement des télomères**, séquences nucléotidiques répétitives (TTAGGG) non codantes qui protègent les extrémités des chromosomes de la dégradation et de la recombinaison anormale, expliquerait le vieillissement. Ainsi, la réduction des télomères des cellules est due à une activité insuffisante de l'enzyme télomérase au cours du vieillissement, qui en condition saine assure l'ajout de la séquence TTAGGG à l'extrémité 3' des télomères pour empêcher leur raccourcissement à chaque division cellulaire (Harley *et al.*, 1990). Les UV peuvent induire un raccourcissement des télomères (Ma *et al.*, 2012).

- Stress oxydatif

Le stress oxydatif peut être induit de manière endogène (mitochondrie) ou exogène (radiation UV, pollution de l'air, tabagisme, etc.) (Lee *et al.*, 2020). Les radicaux libres sont considérés comme la principale cause du processus de vieillissement cutané *via* l'augmentation de la génération de **ROS** et leur accumulation (Kim & Park, 2016). Les ROS activent la voie des **MAPK**, ce qui entraîne l'augmentation de la réponse du facteur de transcription **AP-1**, qui à son tour augmente la production des MMP et diminue la production des collagènes de type I et III par les fibroblastes *via* l'inhibition de la voie du TGF- $\beta$  (Zhang & Duan, 2018 ; Singh *et al.*, 2019 ; Shin *et al.*, 2019). Les ROS activent également la voie **NF- $\kappa$ B** responsable de la régulation positive des MMP et cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et -6, TNF- $\alpha$ ) dans les fibroblastes dermiques (Kim & Park, 2016 ; Shin *et al.*, 2019).

Le stress oxydatif et les ROS contribuent également à l'oxydation accrue de macromolécules (lipides, protéines et ADN) et à leur accumulation, provoquant un dysfonctionnement cellulaire (Kim & Park, 2016).

- Cytokines et protéines

Certaines cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle central dans le vieillissement cutané. Le TNF- $\alpha$  inhibe la synthèse de collagène et induit la production de MMP dans les fibroblastes. L'exposition aux UV augmente les niveaux d'IL (-1, -6 et -18) ce qui peut favoriser l'inflammation cutanée en induisant l'IFN- $\gamma$  (Hirao *et al.*, 1996 ; Omoigui, 2007 ; Kim *et al.*, 2012 ; Lee *et al.*, 2015). Avec l'âge, l'augmentation de l'expression de protéines CCN1 par les fibroblastes dermiques, contribue au vieillissement du tissu conjonctif cutané par la réduction et la dégradation du collagène (Quan *et al.*, 2011).

Le système cutané est donc un système biologique complexe arborant différents types cellulaires, et autres composés dont les rôles sont nombreux. Ainsi, les fibroblastes dermiques humains et la MEC qu'ils sécrètent ont un rôle majeur dans la modulation de ce système cutané et dans le maintien de l'homéostasie cutanée.

Par ailleurs, il a été découvert que les cellules cutanées ne sont pas les seuls acteurs de l'homéostasie cutanée. En effet, une autre composante essentielle du système cutané est impliquée dans ce processus, et correspond au microbiote cutané.



### III. Le microbiote cutané

Les recherches sur le microbiote humain en dermatologie ont commencé dans les années 1950 avec les travaux de Kligman et l'amélioration des méthodes de culture cellulaire (Dréno *et al.*, 2016). En 2008, le NIH (« National Institutes of Health ») a lancé un programme de 5 ans intitulé « Human Microbiome Project » avec pour objectif de séquencer les composants du microbiome humain. Les nouvelles technologies émergentes de métagénomique comme le « next-generation sequencing » permettent désormais une étude plus approfondie du microbiome humain (Bashiardes *et al.*, 2016).

Le **microbiome humain** correspond à l'ensemble des génomes des microorganismes qui vivent en symbiose avec l'hôte humain, ce qui inclut les microorganismes vivants et morts, mais aussi l'ADN libre. Le **microbiote** se réfère aux microorganismes vivants sur ou dans un écosystème défini (Grice & Segre, 2011). Le microbiote humain est principalement établi au niveau de la peau, des voies respiratoires, urinaires et gastro-intestinales, et des muqueuses orales et vaginales. Le microbiote humain a un rôle fondamental dans la santé et les maladies (Wilson & Houpt, 2005 ; Dethlefsen *et al.*, 2007).

#### A. Composition du microbiote cutané

---

Les microorganismes du microbiote cutané interagissent avec le système cutané et leur relation symbiotique peut être classée en trois catégories selon leur mode d'interaction (Cogen *et al.*, 2008 ; Grice & Segre, 2011) :

- Le **commensalisme** où l'un des organismes bénéficie de l'autre qui n'est pas affecté ; on parlera alors de microorganismes commensaux.
- Le **mutualisme** où les deux organismes trouvent des bénéfices ; on parlera de microorganismes mutualistes. Ce terme est encore peu employé pour l'instant mais concerne plusieurs microorganismes dits commensaux dans la littérature.
- Le **pathogénisme** où l'un des organismes bénéficie de l'autre organisme qui est endommagé ; on parlera alors de microorganismes pathogènes. Les microorganismes pathogènes partagent des caractéristiques communes avec les commensaux comme la capacité à pénétrer l'hôte et se multiplier, mais la différence réside dans le fait que les pathogènes sécrètent des toxines et induisent une inflammation cutanée (Di Domizio *et al.*, 2016).

L'**acquisition** du microbiote cutané se fait dès la **naissance**. En effet, *in utero*, la peau est stérile, dépourvue de microorganismes, et quelques minutes après la naissance, elle est colonisée par les microorganismes commensaux de la mère, dépendant du **mode d'accouchement** (Capone *et al.*, 2011). Ce processus précoce de colonisation pendant la période néonatale est essentiel dans l'établissement de la tolérance immunitaire envers les microorganismes commensaux. La colonisation de la peau continue lors de la croissance et atteint à l'âge adulte un état d'équilibre (Dréno *et al.*, 2016).

Pour l'établissement du microbiote cutané, la peau fournit les **nutriments** essentiels à la croissance des microorganismes comme des **acides aminés** issus de l'hydrolyse des protéines et de la sueur, des **acides gras** issus du *stratum corneum*, de la sueur, de l'hydrolyse des lipides et du sébum, et des **acides lactiques** issus de la sueur (Wilson & Houpt, 2005).

Le microbiote cutané fait référence aux microorganismes présents au niveau de l'épiderme de la peau sur le *stratum corneum* mais aussi du derme et des annexes cutanées (Dréno *et al.*, 2016). Ce microbiote se compose de millions de microorganismes, 1 million/cm<sup>2</sup>, et constitue le second microbiote du corps humain en termes de masse (Byrd *et al.*, 2018). Le **microbiote cutané adulte** est constitué de divers microorganismes comprenant des **bactéries**, des **champignons** et **levures** (Gao *et al.*, 2010 ; Findley *et al.*, 2013), des **virus** (Foulongne *et al.*, 2012), des **archées** (Probst *et al.*, 2013) et petits **arthropodes** (principalement *Demodex*) (Lacey *et al.*, 2009). Les bactéries cutanées appartiennent à quatre principaux phyla sur les 36 connus (Kong & Segre, 2012). La distribution cutanée moyenne de ces 4 principaux phyla, détectés sur 20 sites cutanés divers de 10 individus sains, s'est avérée être **Actinobacteria** à 51,8%, **Firmicutes** à 24,4%, **Proteobacteria** à 16,5% et **Bacteroidetes** à 6,3% (Grice *et al.*, 2009 ; Bouslimani *et al.*, 2015). Parmi ces phyla, deux genres bactériens cutanés sont prédominants : ***Staphylococcus*** et ***Cutibacterium*** (Grice *et al.*, 2009).

### **B. *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Cutibacterium acnes* : trois bactéries majeures du microbiote cutané**

---

#### **1. Distribution corporelle de *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes***

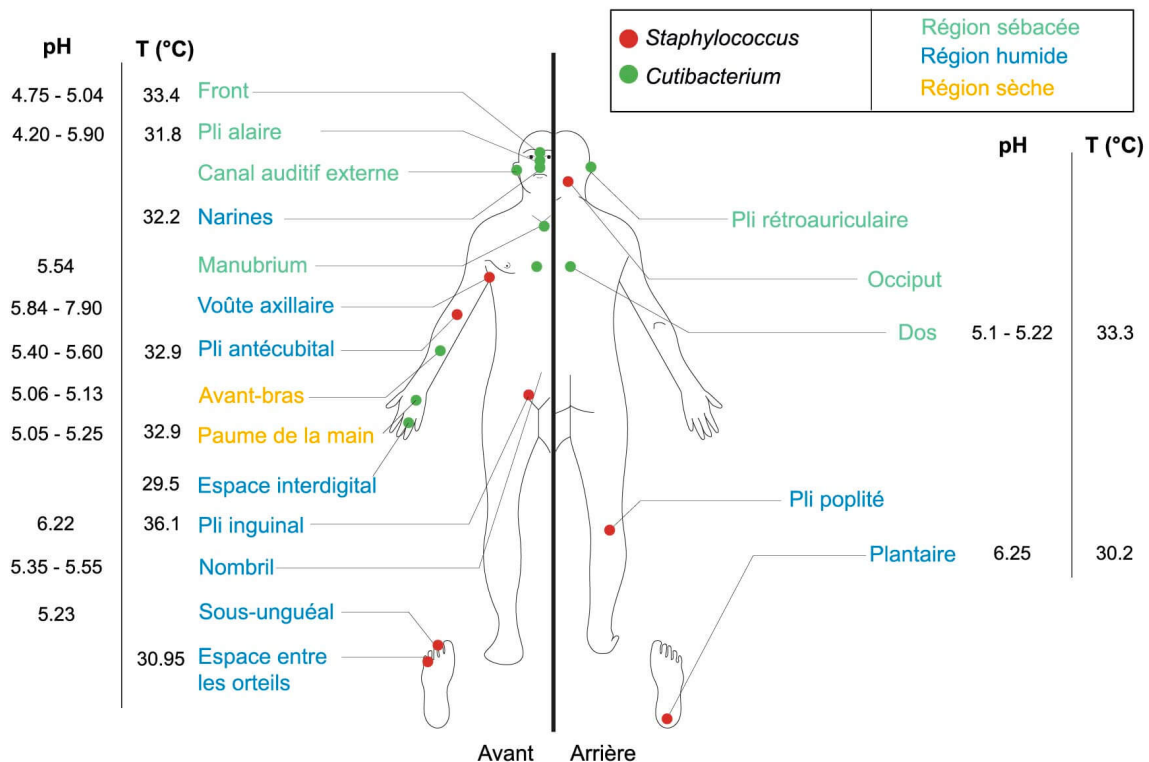
Les bactéries commensales cutanées majeures, *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes*, anciennement appelée *Propionibacterium acnes* (Scholz & Kilian, 2016), sont présentes de façon stable au niveau des couches superficielles de l'épiderme et des annexes cutanées.

Ces bactéries sont largement distribuées au niveau du corps humain selon les conditions de l'environnement cutané. Les **paramètres physico-chimiques** cutanés, principalement la **température**, qui varie de 31,8°C à 36,6°C, le **pH** de 4,2 à 7,9 (Figure 46) (Wilson & Houpt, 2005), et la **quantité d'eau libre** affectent majoritairement la croissance bactérienne.

Par ailleurs, la disponibilité en oxygène varie elle aussi puisqu'elle est de 21% à la surface du *stratum corneum* et diminue jusque 3% au niveau des kératinocytes basaux (Ngo *et al.*, 2007). Ainsi, les bactéries **aérobies** comme *S. epidermidis* et *S. aureus* se situent sur les couches externes du *stratum corneum* tandis que les bactéries **anaérobies** comme *C. acnes* se trouvent dans les couches plus internes ou dans les annexes cutanées comme les follicules pileux (Kong & Segre, 2012). Les bactéries anaérobies comme *C. acnes* sont associées à des cellules spécialisées de l'hôte comme les cellules dendritiques, mélanocytes et cellules de Langerhans (Nakatsuji *et al.*, 2013 ; Dréno *et al.*, 2016).



Trois principales régions cutanées sont identifiées : **humide**, **sèche** et **sébacée** (Figure 46) (Byrd *et al.*, 2018).



**Figure 46 : Distribution topographique des genres bactériens *Staphylococcus* et *Cutibacterium* en fonction du pH et de la température des régions sèches, humides et sébacées**  
Modifié d'après Kong & Segre (2012) et Grice (2015).

Les **régions sébacées** (front, nez, dos et pli derrière le lobe de l'oreille) sont enrichies en **microorganismes lipophiles** notamment le phylum **Actinobacteria** et, plus particulièrement les bactéries du genre ***Cutibacterium*** (Costello *et al.*, 2009). Les glandes sébacées produisent des substances lipidiques comme les triglycérides, les AG, les esters de cholestérol et le squalène, essentielles au développement de ces microorganismes lipophiles (Nicolaidis, 1965).

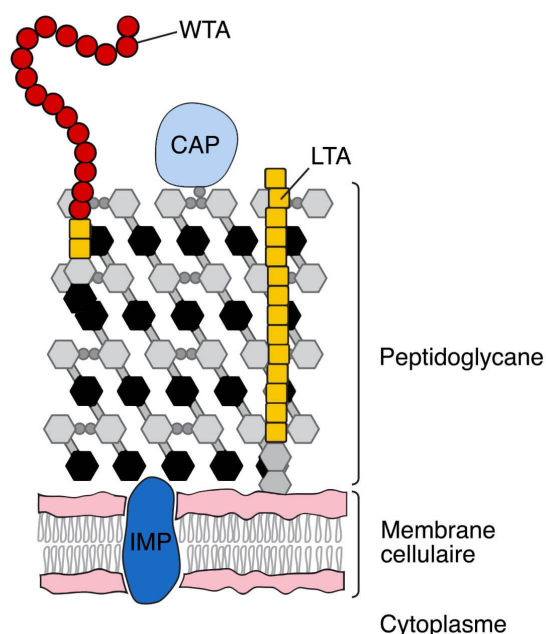
Les **régions humides** (nombriil, fessier, aisselles) sont colonisées par le phylum **Firmicutes** avec principalement des bactéries des genres ***Staphylococcus*** (Grice *et al.*, 2009). La teneur élevée en eau de ces régions est due à la sécrétion de sueur par les glandes sudoripares (Wilson, 2018).

Les **régions sèches**, caractérisées par une faible teneur en sueur et glandes sébacées, sont prédominées par les espèces des genres ***Staphylococcus* et *Cutibacterium*** (Zeeuwen *et al.*, 2012 ; Byrd *et al.*, 2018).

## 2. Trois bactéries à Gram positif

Les bactéries des genres *Staphylococcus* et *Cutibacterium* sont des **Gram positif (G+)** et composants fondamentaux du microbiote cutané.

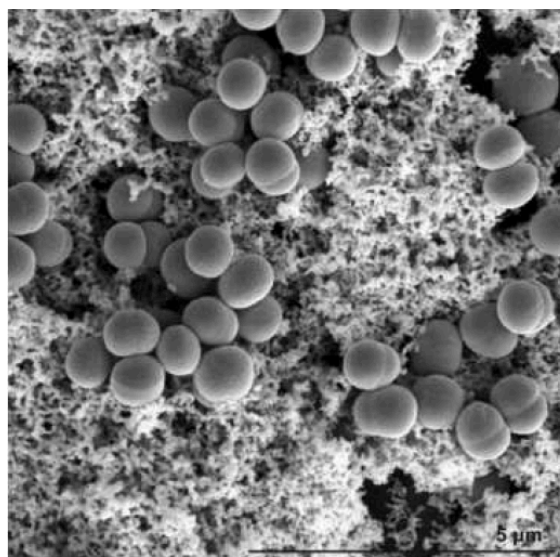
Les bactéries à G+ ont une paroi constituée d'une membrane, de **peptidoglycanes** et de **polymères d'acides téichoïques** (Figure 47). Deux formes principales de polymère d'acide téichoïques, polymères de glycérol ou de ribitol riches en phosphate, sont identifiées : l'**acide lipotéichoïque lié à la membrane cellulaire (LTA)** et l'**acide téichoïque lié au peptidoglycane (WTA)**. Les peptidoglycanes, donnant sa forme et sa rigidité à la bactérie (Silhavy *et al.*, 2010), sont des chaînes polysaccharidiques formées de répétition d'unités disaccharidiques composées de *N*-acétyl-D-glucosamine (NAG) reliées par une liaison glycosidique  $\beta$  (1,4) à l'acide *N*-acétyl-D-muramique (NAM). Les acides NAM sont substitués par une chaîne peptidique permettant la formation d'un pont peptidique inter-chaîne.



**Figure 47 : Structure de la paroi des bactéries à Gram positif**

CAP : protéine associée de manière covalente à la paroi ; LTA : acide lipotéichoïque ; WTA : acide téichoïque lié au peptidoglycane ; IMP : protéine de la membrane interne. Modifié d'après Silhavy *et al.* (2010).

### a) *Staphylococcus epidermidis*



**Figure 48 : *Staphylococcus epidermidis* observé par microscopie électronique à balayage**  
Échelle 5 µm. D'après Bernatová *et al.* (2013).

*S. epidermidis*, du phylum Firmicutes, est un coque à **G+**, rond de 1 µm de diamètre, **aérobie**, anaérobie facultatif, immobile, organisé en grappe (Figure 48) avec une température optimale de croissance comprise entre 30 et 37°C. Il appartient au groupe des « **Coagulase-Negative Staphylococci** » et se distingue donc des staphylocoques à coagulase positive par l'absence de l'enzyme coagulase. *S. epidermidis* se trouve préférentiellement au niveau du *stratum corneum* et peut éventuellement se retrouver au niveau du *stratum basale*, des régions sèches, humides et sébacées (Figure 46) (Nakatsuji *et al.*, 2013 ; Byrd *et al.*, 2018).

### b) *Staphylococcus aureus*

*S. aureus*, du phylum Firmicutes, est une bactérie **aérobie-anaérobie facultative** à **G+**, d'un diamètre de 0,5 à 1,5 µm (Figure 49). Comme *S. epidermidis*, elle est organisée en grappe, immobile, et présente une température optimale de croissance à 37°C. *S. aureus* présente une enzyme coagulase et se caractérise par une pigmentation jaune de ses colonies d'où le nom commun utilisé de « staphylocoque doré ». Au niveau de la peau, *S. aureus* est le deuxième staphylocoque le plus abondant après *S. epidermidis*.

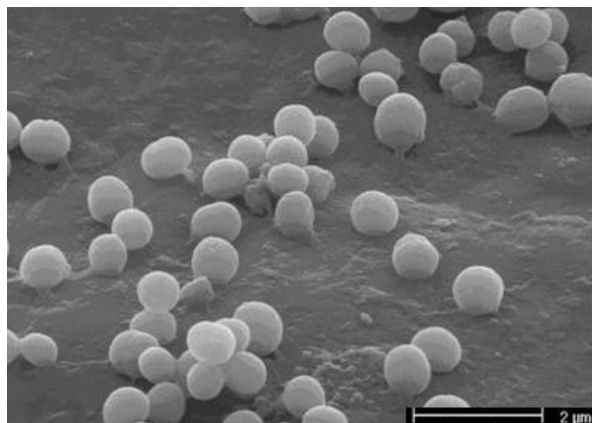


Figure 49 : *Staphylococcus aureus* observé par microscopie électronique à raster Échelle 2 µm. D'après Geipel (2009).

Souvent considéré comme faisant partie de la flore transitoire, dont l'interaction avec le système cutané dépend des conditions environnementales de celui-ci, *S. aureus* fait également parti du microbiote commensal avec un portage estimé de 35 à 60% au sein de la population humaine (Percival *et al.*, 2012). Néanmoins, *S. aureus* est largement connu comme étant la cause de nombreuses infections cutanées de par ses nombreux facteurs de virulence (Dayan *et al.*, 2016).

### c) *Cutibacterium acnes*

*C. acnes*, du phylum Actinobacteria, est une bactérie **anaérobie**, faiblement aérotoleérante, diphtéroïde, à **G+**, en forme de bacille (0,8 µm de long par 0,4 µm de large) (Figure 50) avec une température optimale de croissance à 37°C (Douglas & Gunter, 1946 ; Grice & Segre, 2011). *C. acnes* est catalase positive, indole positive à 70% et capable de réduire le nitrate (Aubin *et al.*, 2014). Les méthodes de métagénomique ont entraîné le changement de dénomination de *Propionibacterium acnes* en *C. acnes* (Scholz & Kilian, 2016) et ont permis de définir six principaux **phylotypes** : **IA1, IA2, IB, IC, II et III** (McDowell *et al.*, 2012) et dix **ribotypes** principaux (**RT1 à 10**), codant des allèles d'**ADNr 16S** uniques (Fitz-Gibbon *et al.*, 2013). Les différents phylotypes et RT de *C. acnes* présentent des différences en potentiel pathogène et propriétés de virulences (McDowell *et al.*, 2012 ; Yu *et al.*, 2016).

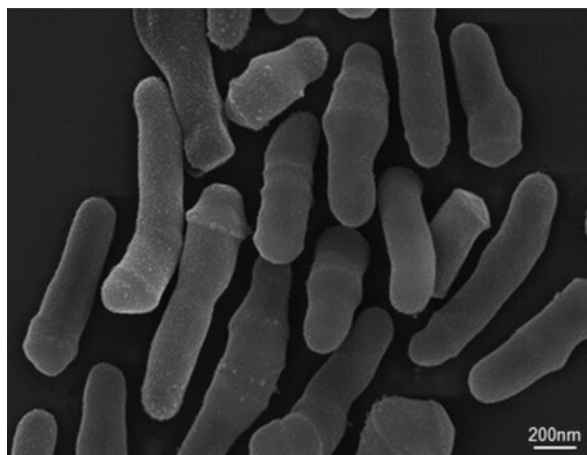


Figure 50 : *Cutibacterium acnes* souche KPA observé par microscopie électronique à balayage Échelle 200nm. D'après Vandenesch *et al.* (2017).

En raison de sa croissance anaérobie, *C. acnes* réside principalement au niveau des régions sébacées, surtout au niveau du visage et du dos, et, plus spécifiquement, au sein des unités pilosébacées (> 95% des espèces bactériennes) : à l'intérieur des follicules pileux et des glandes sébacées (Fitz-Gibbon *et al.*, 2013 ; Dréno, 2017).

*C. acnes* se lie à l'acide oléique du sébum, ce qui facilite sa co-aggrégation dans les zones sébacées. Sa localisation est donc généralement associée à celle des acides oléique et palmitique au niveau de la surface cutanée (Bouslimani *et al.*, 2015). Cette bactérie métabolise, par son activité lipase et son métabolisme central, les AG et autres fluides sébacées ou lipides en **AG libres** comme l'**acide propionique** et l'**acide acétique** (Mukherjee *et al.*, 2016). La production d'acide linoléique conjugué par l'isomérase des AGPI de *C. acnes* sur la peau pourrait être bénéfique dans le maintien d'une peau saine (Christensen & Brüggemann, 2014).

### 3. Mécanismes d'adhésion de *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes* au système cutané

Le processus d'adhésion des bactéries *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes* aux cellules cutanées est médié par composants de surface bactériens spécifiques appelées **MSCRAMM** (« Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules »). Les MSCRAMM sont principalement des protéines bactériennes et notamment des adhésines, qui se lient et interagissent avec des **récepteurs membranaires épidermiques** et des **composants de la MEC** de la peau humaine comme les **GAG** et les **protéines** de l'épiderme et du derme (kératine, élastine, collagène, fibronectine et vitronectine) (Foster & Höök, 1998 ; Otto, 2010).

Les MSCRAMM de *C. acnes* sont principalement deux adhésines : DsA1 et DsA2 (« Dermatan-sulfate Adhesin ») qui possèdent une affinité avec le dermatane sulfate (Brüggemann, 2010). Les MSCRAMM identifiées chez *S. epidermidis* et *S. aureus* sont nombreuses. En effet, on distingue les MSCRAMM suivantes se liant aux composants de la MEC des cellules cutanées humaines :

- Liaison au collagène : protéine SdrF de *S. epidermidis* (Arrecubieta *et al.*, 2007) et protéine Cna de *S. aureus* (Patti *et al.*, 1992).
- Liaison à l'élastine : protéine EbpS de *S. aureus* (Downer *et al.*, 2002), potentiellement présente chez *S. epidermidis* (Otto, 2009).
- Liaison à la vitronectine de façon non covalente : adhésine capsulaire polysaccharidique (PSA) et autolysines AtlE et Aae de *S. epidermidis* (Heilmann, 2011).
- Liaison au fibrinogène : protéine Fbe (SdrG) de *S. epidermidis* et protéine ClfB de *S. aureus* (Eldhin *et al.*, 1998).
- Liaison à la fibronectine : protéine Embp de *S. epidermidis* (Williams *et al.*, 2002) et protéines Ebh (Clarke *et al.*, 2002), FnBPA et FnBPB de *S. aureus* (O'Neill *et al.*, 2008 ; Edwards *et al.*, 2011).

Les récepteurs membranaires épidermiques avec lesquels interagissent les bactéries *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes* sont des **PRR** (« Pattern Recognition Receptors ») et, plus particulièrement, ceux de la famille des **TLR** (« Toll-Like Receptors »). Les TLR sont des glycoprotéines membranaires caractérisées par un domaine extracellulaire avec des répétitions riches en leucine et un domaine cytoplasmique de transduction du signal (Botos *et al.*, 2011). Les TLR2, majoritaires (Kumar *et al.*, 2011), reconnaissent les **PAMP** (« Pathogen-Associated Molecular Patterns ») comme les LTA et peptidoglycanes des bactéries à G<sup>+</sup> (Kaisho & Akira, 2006).

Ainsi, les cellules cutanées sont en interaction permanente avec les bactéries *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes* via leur TLR2 (Sanford & Gallo, 2013). Finalement, ces trois commensaux via leurs MSCRAMM interagissent avec les protéines et GAG de la peau et les TLR2, permettant ainsi l'établissement de voies de coordination entre les bactéries et les cellules cutanées.

## C. Commensalisme de *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes* avec le système cutané

---

Les bactéries commensales ont une relation symbiotique avec le système cutané. Plus spécifiquement, dans le cas des souches commensales de *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes*, la définition du mutualisme pourrait également convenir. En effet, la peau abrite ces commensaux et fournit les nutriments indispensables à leur croissance, tandis qu'à leur tour les bactéries participent à l'homéostasie cutanée, à la défense de l'hôte et à son système immunitaire (Cogen *et al.*, 2008 ; Sanford & Gallo, 2013). Dans un microbiote cutané sain et une barrière cutanée saine, ces bactéries aident la peau à combattre les bactéries pathogènes via trois mécanismes : (1) **l'inhibition directe de la croissance des pathogènes**, le principal mécanisme ; (2) l'amélioration de **l'immunité innée** ; et (3) l'amélioration de **l'immunité adaptative** de l'hôte (Figures 51 et 52, p. 118 et 119) (Sanford & Gallo, 2013).

### 1. Inhibition directe de la croissance des pathogènes

#### a) Occupation de la niche écologique et modifications des TLR

Les microorganismes commensaux, présents au niveau de la peau, entrent en compétition avec les espèces pathogènes pour les nutriments et l'espace ce qui limite donc la possibilité de croissance des pathogènes à la surface de la peau (Sanford & Gallo, 2013). *S. epidermidis* et *C. acnes* sont également capables de désensibiliser les TLR via leur constante exposition à ces commensaux, ou de diminuer l'expression des TLR impliqués dans la reconnaissance des pathogènes (Grice & Segre, 2011).

#### b) Les bactériocines, endopeptidases, MMP et phénol-solubles modulines comme ligne de défense

*S. epidermidis* et *C. acnes* peuvent aussi inhiber directement la croissance des pathogènes via la production de bactériocines, composés protéiques antimicrobiens produits par les bactéries. *S. epidermidis* produit les bactériocines sous le contrôle de son système de Quorum Sensing (QS) *agr* (« accessory gene regulator ») (Kies *et al.*, 2003). Les bactériocines de *S. epidermidis* correspondent à des lantibiotiques, peptides de taille inférieure à 5 kDa possédant des acides aminés thioether, comme l'épidermine, Pep5, l'épilancine K7 et l'épicidine 280 (Bastos *et al.*, 2009).

Ainsi, *S. epidermidis* prévient la formation de biofilm de souches virulentes de *S. aureus* et de souches pathogènes formant des biofilms de *S. epidermidis* (Christensen & Brüggemann, 2014), via la sécrétion de bactériocines, de MMP, de Phénol-Solubles Modulines (PSM) et d'Endopeptidase sérine protéase (Esp) (Figure 52, p. 119) (Iwase *et al.*, 2010 ; Vandecandelaere *et al.*, 2014).



L'Esp dégraderait spécifiquement les protéines de *S. aureus* impliquées dans la formation de son biofilm et les protéines associées à la colonisation de l'hôte (Sugimoto *et al.*, 2013). Les bactériocines produites par les souches commensales de *C. acnes* (propioniques et acnéine) ont une action directe *in vitro* dirigée contre des souches pathogènes virulentes de *Cutibacterium*, mais également contre des bactéries lactiques, des bactéries à Gram négatif et des levures. Il est supposé que ce procédé protégerait *in vivo* l'unité pilosébacée et le conduit sécrétoire contre les microorganismes pathogènes (Cogen *et al.*, 2008 ; O'Neill & Gallo, 2018).

Les PSM sont des peptides aux fonctions antimicrobiennes importantes, produits par les bactéries. Ils ont une structure similaire aux peptides antimicrobiens humains (AMP, « AntiMicrobial Peptides ») avec la capacité de provoquer des fuites au niveau de la membrane lipidique d'autres bactéries (Cogen *et al.*, 2010a). Les PSM $\delta$  et PSM $\gamma$ , produites par *S. epidermidis*, tuent sélectivement les pathogènes comme *S. aureus* et coopèrent avec les AMP de l'hôte afin d'augmenter la destruction des pathogènes (Cogen *et al.*, 2010b).

### c) Les acides gras et autres métabolites

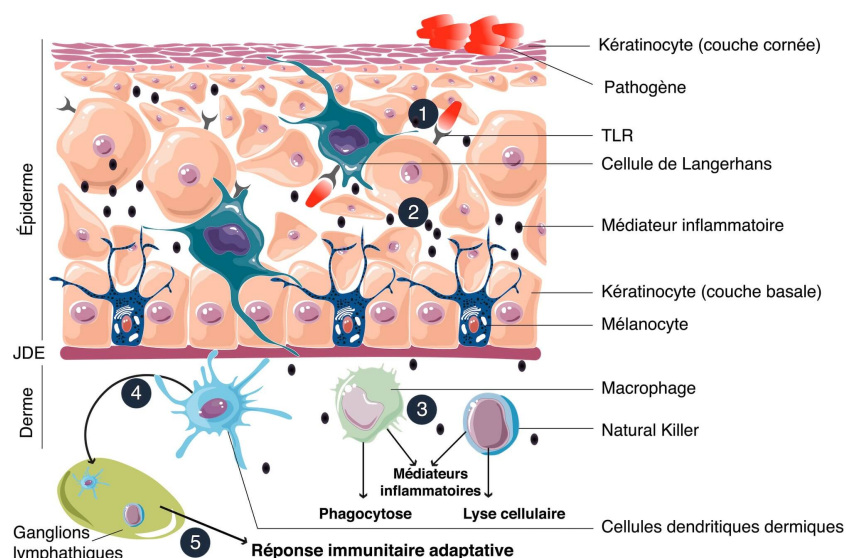
Dans une peau saine, *C. acnes* fermente le glycérol en AG libres à chaînes courtes, principalement l'acide propionique. La baisse de pH induite de l'environnement cutané protège le follicule pilosébacé et inhibe la croissance de souches pathogènes (Figure 52, p. 119) (Shu *et al.*, 2013a) et favorise également la croissance levures lipophiles comme *Malassezia* (Ladizinski *et al.*, 2014). Le commensal *S. aureus* est également capable *via* la fermentation du glycérol de produire des AG libres à chaînes courtes pouvant inhiber la croissance de pathogènes (Yang *et al.*, 2018), tout comme *S. epidermidis* qui, avec la production d'acide acétique, butyrique, lactique ou succinique, inhibe la formation de biofilm de *C. acnes* (Wang *et al.*, 2014b). Par ailleurs, le commensal *S. epidermidis* produit également des métabolites tels que le glycérol ou des acides organiques comme l'acide lactique et des NMF (acides aminés, urée, etc.), connus pour améliorer la rétention d'eau, augmenter la teneur en lipides cutanés, maintenir un état légèrement acide de la surface de la peau et ainsi limiter la colonisation par des souches pathogènes de *S. aureus* (Nodake *et al.*, 2015).

## 2. Stimulation du système immunitaire inné

Le Système Immunitaire (SI) cutané comprend :

- Des cellules résidentes cutanées : cellules de Langerhans, cellules T épidermiques transitoires, macrophages, cellules dendritiques dermiques mais aussi kératinocytes et fibroblastes. Ces cellules présentent notamment des TLR pouvant aboutir à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B impliquée dans l'inflammation (Liu *et al.*, 2017).
- Une large variété de médiateurs solubles dont les AMP, cytokines et chimiokines (Figure 51).

Ce SI inné assure le maintien de l'homéostasie cutanée, et est responsable de l'activation et de la régulation des réactions inflammatoires normales et pathologiques (Venus *et al.*, 2011 ; Abdallah *et al.*, 2017). Le fonctionnement du SI cutané diffère en présence d'un organisme commensal ou d'un pathogène (Sanford & Gallo, 2013 ; Belkaid & Segre, 2014).



**Figure 51 : Schéma de la réponse immunitaire cutanée innée primaire**

❶ Reconnaissance des pathogènes par les kératinocytes et cellules de Langerhans (porteuses de TLR) et établissement d'une réponse immunitaire coordonnée : production d'AMP ❷, sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires pour alerter les cellules immunitaires ❸, activation des cellules immunitaires (ex : cellules « Natural Killer » et macrophages) ❹, maturation des cellules dendritiques dermiques migrant jusqu'aux ganglions lymphatiques et amorçage de l'immunité adaptative ❺, avec la réponse des lymphocytes T. Modifié d'après Abdallah *et al.* (2017)

### a) L'induction de peptides antimicrobiens (AMP)

Les kératinocytes sont les premiers détecteurs d'une invasion par un pathogène et sont donc les initiateurs de la réponse immunitaire. Couramment appelées sentinelles de l'immunité, ces cellules sont également impliquées dans la coordination des réponses immunitaires (Xu *et al.*, 2019).

Les AMP sont des molécules effectrices du SI inné cutané contenant deux principales familles : les cathélicidines (majoritairement peptide LL-37) et les  $\beta$ -défensines humaines (hBD, « human Beta Defensin »). hBD1 est exprimée constitutivement dans les kératinocytes tandis qu'hBD2 et hBD3 sont exprimées fortement lors d'une inflammation (Niyonsaba *et al.*, 2006 ; Schaubert & Gallo, 2008 ; Venus *et al.*, 2011 ; Nakatsuji & Gallo, 2012 ; Lai-Cheong & McGrath, 2017 ; Coates *et al.*, 2018 ; Xu *et al.*, 2019). Les AMP sont capables de tuer les bactéries, les levures et les virus, et déclenchent le recrutement de cellules inflammatoires et la libération de cytokines impliquées dans la défense de l'hôte (étapes ❶ et ❷, Figure 51) (Niyonsaba *et al.*, 2006).

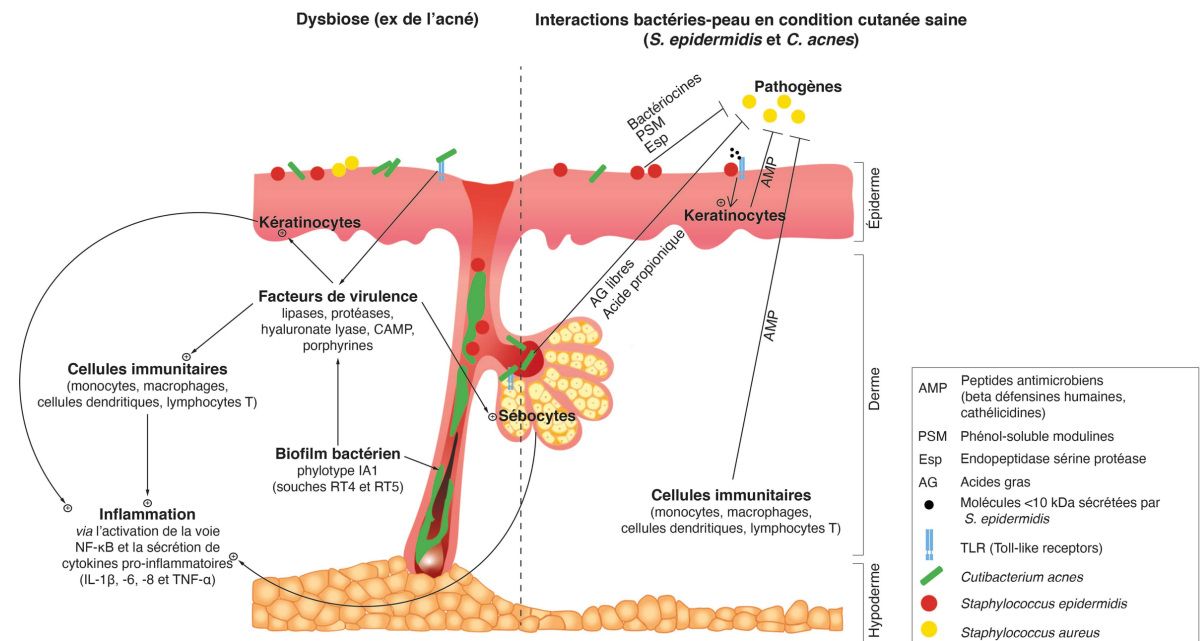
Les commensaux ont la capacité à induire la production de ces AMP par les cellules de l'hôte comme les kératinocytes, les sébocytes et les cellules immunitaires (Gallo & Nakatsuji, 2011 ; Sanford & Gallo, 2013). *S. epidermidis*, via un mécanisme TLR2-dépendant et la sécrétion de molécules (< 10 kDa), induit l'augmentation de l'expression d'hBD2 et hBD3 par les kératinocytes et renforce donc l'immunité contre des souches pathogènes de *S. aureus* (Figure 52) (Lai *et al.*, 2010 ; Wanke *et al.*, 2011). L'Esp produit par *S. epidermidis* permet également de renforcer l'effet antimicrobien d'hBD2 (Iwase *et al.*, 2010).

### b) Modulation des TLR2/TLR3 et de la production de cytokines

L'activation des TLR2 par *S. epidermidis* permet également le maintien de la barrière cutanée via l'augmentation des jonctions serrées au niveau des kératinocytes en culture (Yuki *et al.*, 2011).

Après l'induction de la sécrétion d'AMP, la voie NF-κB est activée et une augmentation du niveau de cytokines pro-inflammatoires a lieu au niveau de l'épiderme (étape ②, Figure 51) (Lai *et al.*, 2010 ; Wanke *et al.*, 2011 ; Percoco *et al.*, 2013). *S. epidermidis*, via la sécrétion de molécules (< 10 kDa) et un mécanisme TLR2-dépendant, augmente la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1α et β au niveau de l'épiderme (Figure 52) (Lai *et al.*, 2010 ; Wanke *et al.*, 2011).

De plus, les LTA produits par *S. epidermidis* peuvent induire la sécrétion d'IL-10 et inhiber l'inflammation cutanée pendant la cicatrisation ou dans des pathologies cutanées, via un hypothétique mécanisme réciproque médié par TLR2 et TLR3 (Lai *et al.*, 2009). Cela impliquerait l'augmentation de l'induction du recrutement de mastocytes dans les régions cutanées contaminées par un virus, ou la stimulation de la maturation de LT via l'activation de TLR2 (Wang *et al.*, 2012), ou la réduction de l'inflammation induite par une souche virulente de *C. acnes* via l'inhibition de l'expression de TLR2. Dans ce dernier cas, les LTA de *S. epidermidis* activent TLR2 ce qui induit la production de microARN-143 (miR-143) dans les kératinocytes. À leur tour, les miR-143 diminuent la stabilité des ARNm de TLR2 et sa production protéique, ce qui inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF-α) induite par une souche virulente de *C. acnes* (Xia *et al.*, 2016). Aussi, la production d'acide succinique inhibe les TLR des kératinocytes et inhibe l'expression d'IL-6 et TNF-α induite par une souche virulente de *C. acnes* (Wang *et al.*, 2016a ; Skabytska & Biedermann, 2016). Les LTA de *S. epidermidis* peuvent aussi se lier aux TLR2 et inhiber la voie TLR3 (Lai *et al.*, 2009).



**Figure 52 : Schéma des interactions peau – bactéries dans le cadre d'une peau saine et dans le cadre d'une dysbiose (exemple de l'acné) : focus sur *S. epidermidis* et *C. acnes***  
Modifié d'après O'Neill & Gallo (2018) et Claudel *et al.* (2019).

Ainsi, la promotion de la croissance de souches commensales de *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes*, ou de la production de leur métabolites ou sous-produits comme les bactériocines, l'acide propionique, les LTA, les molécules spécifiques < 10 kDa, et la modulation des TLR2 sont des voies intéressantes à étudier dans le cadre cosmétique pour la prévention d'infection par des pathogènes ou dans le maintien de l'homéostasie cutanée.



## D. Passage du commensalisme à la pathogénicité opportuniste de *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes* : formation de biofilms et corrélation avec des dysbioses cutanées courantes

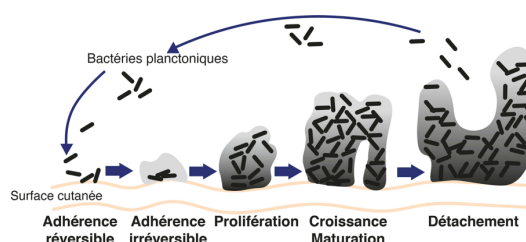
Il est important de constater que lorsque l'on parle du microbiote cutané, ce n'est pas « tout blanc ou tout noir » et un passage entre commensalisme et pathogénisme est souvent observé lorsque la barrière cutanée est perturbée. L'altération de la barrière cutanée se manifeste par une augmentation drastique du pH cutané et de la perte en eau, une desquamation, l'apoptose des kératinocytes et l'inflammation faisant intervenir les cellules immunitaires (Matejuk, 2018). Dans un état de pathogénisme cutané, des **souches virulentes** de *C. acnes*, *S. aureus* et *S. epidermidis* se retrouvent couramment sous leur forme de **biofilm** et produisent des facteurs de virulences. Ceci est couramment corrélé à une **pathologie** cutanée comme l'acné (Coenye *et al.*, 2007) ou la dermatite atopique (Gonzalez *et al.*, 2017).

Une **dysbiose** est un déséquilibre du microbiote en termes de diversité et de fonctionnement, souvent caractérisé par une **composition anormale** en microorganismes (abondance de pathogènes et/ou déficit d'espèces commensales, perte de diversité) associée à une perturbation de la fonction barrière de la peau, et corrélée à des conditions cutanées pathologiques chroniques (Dréno *et al.*, 2016). Cependant, le lien cause-conséquence entre la dysbiose du microbiote et les pathologies cutanées reste pour l'instant indéterminé (Kong & Segre, 2012).

Le biofilm bactérien cutané est une **communauté bactérienne** caractérisée par des bactéries fortement **attachées** à la peau (surface biotique), et protégée par une **matrice extracellulaire complexe**, riche en polysaccharides (**EPS** pour « Exopolymeric/Extracellular Polymeric Substances »), ADN, protéines et lipides, produite par les bactéries et dans laquelle celles-ci sont agglomérées (Brandwein *et al.*, 2016). La matrice riche en EPS régule la croissance et le métabolisme des bactéries, et confère une résistance aux molécules antibactériennes (antibiotiques) et une résistance à l'action des cellules immunitaires de l'hôte (Vlassova *et al.*, 2011).

La formation du biofilm repose sur 4 étapes :

- L'**adhérence** initiale réversible puis irréversible
- La **prolifération** avec la formation de microcolonies
- La **maturation**
- Le **détachement** du biofilm (Figure 53).



**Figure 53 : Représentation générale des étapes de la formation d'un biofilm**

La formation du biofilm dépend du **Quorum Sensing** (QS) et est influencée par les conditions physico-chimiques de la surface (humidité, pH, température), disponibilité en nutriment, récepteurs de l'hôte et système immunitaire local (Brandwein *et al.*, 2016).

Les molécules peptidiques du QS des G+ permettent la synchronisation des activités et des réponses des communautés microbiennes comme la sécrétion de facteurs de virulence et la formation de biofilm (Waters & Bassler, 2005 ; Li *et al.*, 2008 ; Le & Otto, 2015).

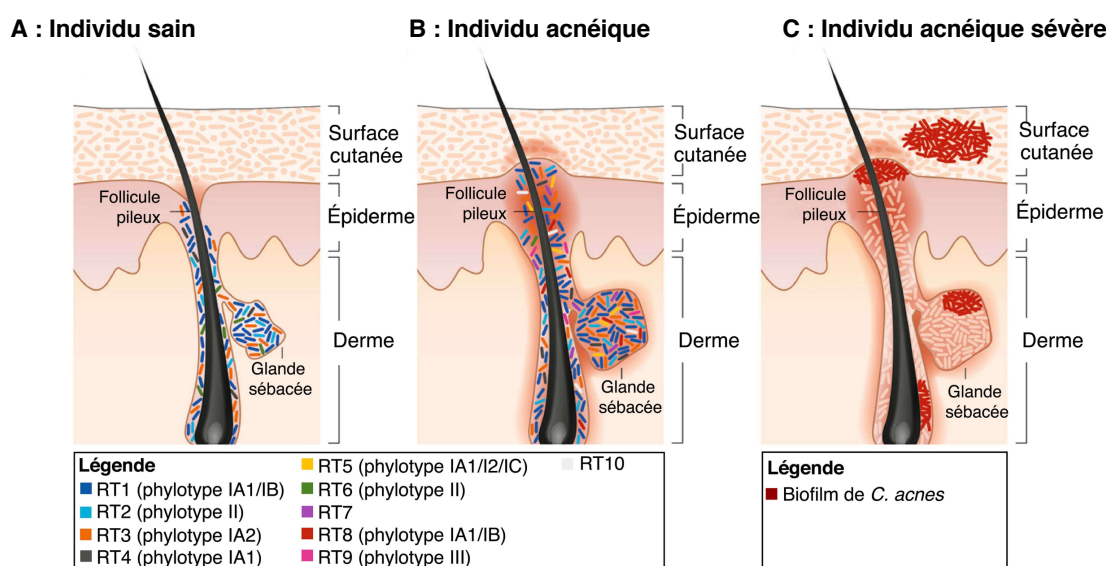
## 1. Biofilm de *C. acnes* et perte de diversité des phylotypes : implication dans l'acné

L'acné vulgaire est une pathologie cutanée inflammatoire chronique de l'unité pilosébacée. Les trois principaux acteurs impliqués dans le développement de l'acné sont :

- les **glandes sébacées** avec une hyperséborrhée qualitative et quantitative caractérisée par une diminution des AG libres et une augmentation des fractions lipidiques pro-inflammatoires (AG monoinsaturés et lipoperoxydes) (Downing *et al.*, 1986 ; Zouboulis, 2004 ; Ottaviani *et al.*, 2006).
- les bactéries ***C. acnes*** et ***S. epidermidis*** avec *C. acnes* représentant moins de 2% des bactéries de surface de la peau et *Staphylococcus* restant le genre prédominant à la surface du comédon (Nishijima *et al.*, 2000 ; Fitz-Gibbon *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2014b). Même si la proportion de staphylocoques augmente significativement avec la sévérité de l'acné (Dréno *et al.*, 2017), *S. epidermidis* ne présente pas de propriétés pro-inflammatoires (Bialecka *et al.*, 2005). Il apparaîtrait plutôt comme un nouvel acteur dans la physiopathologie de l'acné (Dréno *et al.*, 2017 ; Claudel *et al.*, 2019) via une activité antimicrobienne contre les souches acnéiques et non acnéiques de *C. acnes* (Christensen *et al.*, 2016).
- les **kératinocytes** avec l'hyperkératinisation de l'unité pilosébacée aboutissant à la formation des comédons, papules et pustules (Dréno, 2017).

### a) Dysbiose de *C. acnes*

La pathologie de l'acné n'est pas liée à une différence significative d'abondance relative de *C. acnes* entre les sujets sains et les patients acnéiques. Elle est liée à une **perte de diversité des phylotypes** de *C. acnes* avec une **prédominance** dans la pathogénèse du **phylotype IA1** représentant 55% à 68% des isolats (Figure 54) (Paugam *et al.*, 2017 ; Dagnelie *et al.*, 2017, 2019).



**Figure 54 : Distribution de l'abondance relative de souches de *C. acnes* au sein de l'unité pilosébacée du nez entre des patients acnéiques et sains**

**A** : Abondance relative normale des souches de *C. acnes* dans les individus sains ; **B** : Dysbiose de l'acné caractérisée par une perte de diversité de *C. acnes* (abondance augmentée de RT4 et RT5, et diminution de RT6) ; **C** : Persistance de l'acné associée à la formation de biofilm de *C. acnes* au niveau de la surface cutanée, de la glande sébacée, du follicule pileux et du pore cutané. Modifié d'après Brandwein *et al.* (2016).

En effet, le phylotype IA1 est fortement associé à une acné modérée à sévère alors que les phylotypes IB, II et III sont associés à des sujets sains ou des infections opportunistes (Lomholt & Kilian, 2010 ; Fitz-Gibbon *et al.*, 2013). En effet, au niveau des lésions acnéiques inflammatoires, la proportion de phylotype IA de *C. acnes* est augmentée tandis que celles des phylotypes IB et II est diminuée (Kwon *et al.*, 2013 ; Lomholt *et al.*, 2017 ; Dagnelie *et al.*, 2018, 2019). Le phylotype III n'est pas identifié dans les lésions acnéiques (McDowell *et al.*, 2012).

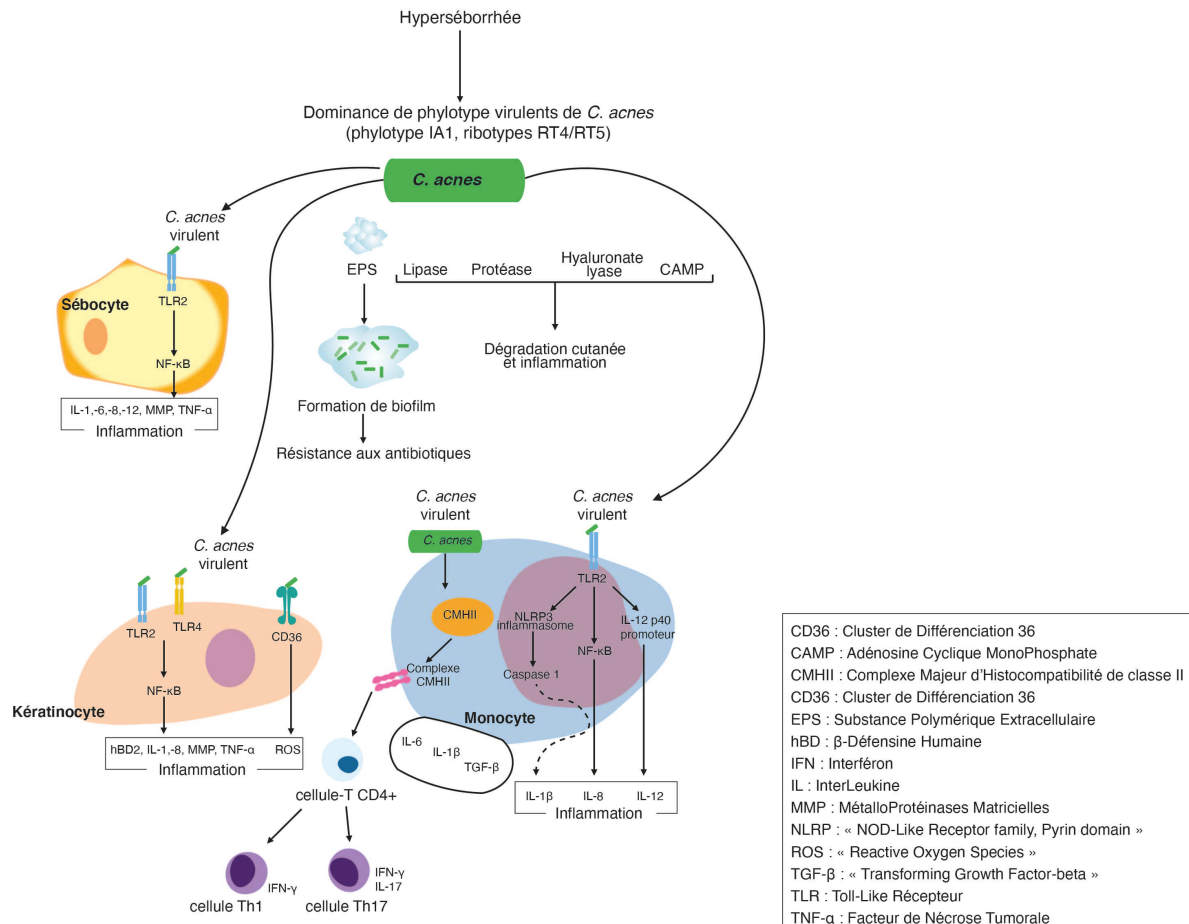
Les **RT4 et RT5 phylotype IA1** sont prédominants (30-40%) chez les patients **acnéiques** et peu retrouvés dans les peaux saines tandis que le **RT6 du phylotype II** est lui associé à une **peau saine** (99%) (Figure 54) (McDowell *et al.*, 2012 ; Fitz-Gibbon *et al.*, 2013). L'étude de Borrel *et al.* (2019a) suggère que l'expression différentielle de la virulence de souches acnéiques et non acnéiques de *C. acnes* est associée à leurs différentes niches environnementales. La souche acnéique RT4, avec sa surface lipophile, présente une croissance maximale et une activité de formation de biofilm augmentée dans un Milieu Sébum-Like (SLM) mimant l'environnement de la glande sébacée. En revanche, la souche commensale RT6, avec sa surface plus polaire, croît préférentiellement dans un milieu RCM (« Reinforced-Clostridial Medium ») enrichi en oligoéléments et acides aminés, et a une activité de formation de biofilm maximale dans un milieu classique BHI (« Brain Heart Infusion ») (Borrel *et al.*, 2019a). Par ailleurs, la souche RT4 exerce un potentiel inflammatoire supérieur sur les kératinocytes en comparaison avec RT6, indépendamment du milieu de culture (Borrel *et al.*, 2019a). Les études suggèrent que le phylotype IA1 et certains ribotypes (RT4 et RT5) de *C. acnes* prolifèrent mieux dans le microenvironnement de lésions inflammatoires, ou qu'ils ont la capacité à intensifier le processus inflammatoire lorsque celui-ci est déjà initié (Kwon & Suh, 2016 ; Borrel *et al.*, 2019a).

### **b) Production de facteurs de virulence, formation de biofilm et inflammation induite par *C. acnes***

#### **i. Facteurs de virulence**

Les souches du phylotype IA ou IA1 de *C. acnes* issues de patients acnéiques, en comparaison avec les autres phylotypes, produisent de plus grandes quantités de facteurs de virulence ou ont leurs activités de virulence augmentées. Les facteurs de virulence regroupent la **lipase triacylglycérol** (Higaki *et al.*, 2000 ; Coenye *et al.*, 2007) et les **porphyrines** contribuant à la réaction d'inflammation périfolliculaire (Shu *et al.*, 2013b ; Oyewole & Birch-Machin, 2015 ; Johnson *et al.*, 2016), et la **hyaluronate lyase** impliquée dans l'adhérence et l'invasion qui dégrade le derme et les composants de la MEC (Cogen *et al.*, 2008 ; Nazipi *et al.*, 2017) (Figure 55). Les **CAMP** (« Christie-Atkins-Munch-Petersen »), notamment CAMP1 (Jahns *et al.*, 2012), protéines agissant comme des enzymes de dégradation des tissus de l'hôte *via* la formation de pores dans les membranes des cellules (Liu *et al.*, 2011 ; Nakatsuji *et al.*, 2011) sont également considérés comme des facteurs de virulence (Figure 55). Une analyse protéomique des souches de *C. acnes* a récemment montré que l'expression des facteurs de virulence était souche-spécifique mais également milieu-spécifique. En effet, les CAMP étaient surexprimés dans le BHI et le RCM par la souche acnéique RT4 tandis que la lipase triacylglycérol était seulement exprimée par la souche non acnéique RT6 dans le SLM (Borrel *et al.*, 2019a).

Les différents facteurs de virulence peuvent également interagir avec l'oxygène moléculaire, puis générer des ROS et des radicaux libres qui à leur tour endommagent les kératinocytes et favorisent ainsi l'inflammation périfolliculaire dans l'acné (Liu *et al.*, 2011 ; Nakatsuji *et al.*, 2011 ; Beylot *et al.*, 2014). Ce processus de dommages aux kératinocytes et à la MEC *via* la virulence de *C. acnes* pourrait être impliqué dans la voie du vieillissement cutané (Fournière *et al.*, 2020).



**Figure 55 : Modèle proposé des principaux processus induits par *C. acnes* au niveau des kératinocytes, sébocytes et monocytes dans l'acné vulgaire**  
 Modifié d'après Lee *et al.* (2019).

## ii. Biofilm

En 2007, il a été démontré que *C. acnes* est capable *in vitro* de former des biofilms (Coenye *et al.*, 2007) et, plus récemment, que la formation du biofilm est influencée par la température avec un optimum à 37°C (Gannesen *et al.*, 2018a). En 2012, il a été montré pour la première fois *in vivo* que les phylotypes IA et II de *C. acnes* sont capables de croître en macrocolonies en produisant un important biofilm en profondeur du follicule sébacé (Jahns *et al.*, 2012).

Le biofilm des souches virulentes de *C. acnes* est un facteur clé de virulence dans la pathogenèse de l'acné (Figure 52 p. 119 et Figure 55) (Burkhart & Burkhart, 2007 ; Holmberg *et al.*, 2009 ; Ionescu *et al.*, 2015). *In vitro*, les isolats de *C. acnes* issus de peaux acnéiques produisent davantage de biofilms que les isolats de peaux saines (Holmberg *et al.*, 2009).

La capacité de formation de biofilm correspond généralement au phylotype puisqu'il a été montré *in vitro* que les isolats de phylotype IA1 ont la capacité de formation de biofilm la plus élevée, suivie des phylotypes IC, IA2 et II, tandis que les phylotypes IB et III présentent la formation de biofilm la plus faible (Kuehnast *et al.*, 2018). Le biofilm de *C. acnes* contribue à la production d'une colle biologique (EPS) qui maintient les cornéocytes ensemble et conduit à l'apparition de microcomédons (Burkhart & Burkhart, 2007).

### iii. Inflammation

La promotion de l'inflammation dans l'acné est réalisée par la sécrétion des facteurs de virulence et le biofilm des souches de *C. acnes* du phylotype IA, en particulier les souches acnéiques RT4 et RT5 (Figure 52 p. 119 et Figure 55 p. 123). Le **phylotype IA** virulent de *C. acnes* active les TLR2 au niveau des kératinocytes, sébocytes, monocytes et macrophages. Ceci induit une **réponse inflammatoire** avec l'activation de la **voie NF- $\kappa$ B** et la production de **ROS**. L'inflammation induite par *C. acnes* est caractérisée *in vitro* par la production de :

- **Cytokines pro-inflammatoires** comme les IL (-1 $\beta$ , -6, -8 et -12) et le TNF- $\alpha$ .
- **AMP** principalement hBD2 (Nagy *et al.*, 2005, 2006 ; Cogen *et al.*, 2008 ; Lee *et al.*, 2010 ; Christensen & Brüggemann, 2014 ; Cong *et al.*, 2019).
- **MMP** comme MMP-9 dans les kératinocytes et sébocytes, et de pro-MMP-2 dans les fibroblastes dermiques (Jugeau *et al.*, 2005 ; Nagy *et al.*, 2006 ; Choi *et al.*, 2008).

Des souches virulentes de *C. acnes* stimulent également la production de sébum (Beylot *et al.*, 2014) et induisent de manière anormale la différenciation et la prolifération des cellules épidermiques (Jarrousse *et al.*, 2007 ; Akaza *et al.*, 2009).

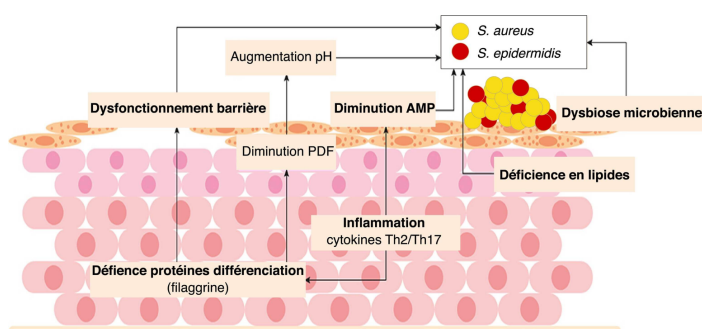
Tous ces mécanismes, induits par les souches virulentes de *C. acnes*, favorisent l'inflammation cutanée *in vitro* sur des monocultures cellulaires. Le phylotype IA1 de *C. acnes*, en comparaison avec une combinaison de phylotypes (IA1 + II + III), cultivés sur un explant cutané sain, issu d'abdominoplastie, régule positivement l'expression de marqueurs de l'immunité innée (IL-1 $\beta$ , -10 et -17, TLR2 et hBD2), et les niveaux de cytokines pro-inflammatoires sécrétées (IL-6, -8, -10 et -17) (Dagnelie *et al.*, 2019). Ce résultat sur un modèle de peau 3D renforce les données des études précédentes sur la monoculture cellulaire.

## 2. Biofilm et perte de diversité de *S. aureus* et *S. epidermidis* : implication dans la dermatite atopique

Bien qu'il soit très généralement supposé que les isolats de *S. epidermidis* ont un comportement similaire, commensal, de nouvelles preuves suggèrent que la colonisation par des souches spécifiques de *S. epidermidis* peuvent nuire à la barrière cutanée selon le contexte (Brown & Horswill, 2020). Au contraire, les isolats de *S. aureus* sont marginalement présentés comme commensaux et nombreuses sont les études relatant sa pathogénicité (Liu *et al.*, 2018). En s'intéressant au domaine cutané, certaines souches pathogènes de *S. epidermidis* et *S. aureus* ont été détectées chez des patients souffrant de **Dermatite Atopique** (DA) (Allen & Mueller, 2011 ; Hon *et al.*, 2016).

La DA est une pathologie cutanée chronique inflammatoire **multifactorielle** (Peng & Novak, 2015), évoluant par poussées, qui touchent jusqu'à 20% des enfants et 10% des adultes (Clausen *et al.*, 2018). Elle se caractérise par un **dysfonctionnement de la barrière cutanée** avec (Figure 56) :

- Une **déficience en lipides variés** comme les céramides, le cholestérol et les AG libres.
- Une **déficience en protéines de différenciation des kératinocytes** comme la filaggrine, la loricrine et l'involucrine.
- Une **inflammation** caractérisée par un SI stimulé avec la libération de cytokines pro-inflammatoires après activation des LT.
- Une **diminution** de la production d'**AMP**.
- Une **altération du microbiote** avec une diminution de la diversité bactérienne (David Boothe *et al.*, 2017).



**Figure 56 : Pathogénèse de la dermatite atopique et implication de *S. aureus* et *S. epidermidis***  
AMP : peptides antimicrobiens ; PDF : produits de dégradation de la filaggrine. Modifié d'après Kim *et al.* (2019).

### a) Dysbiose de *S. aureus* et *S. epidermidis*

Dans la DA, la diversité microbienne est inversement corrélée à la sévérité de la maladie (Kong *et al.*, 2012 ; Clausen *et al.*, 2018). *S. epidermidis* prédomine au niveau de patients avec une DA moins sévère alors que *S. aureus* prédomine dans les DA sévères (Byrd *et al.*, 2017). L'augmentation de la colonisation par *S. aureus* est largement corrélée à la DA avec jusqu'à 90% de cette souche chez les patients atteints de DA. Dans les lésions de DA, *S. epidermidis* représente l'autre espèce majoritaire (20%) (Clausen *et al.*, 2018).

### b) Production de facteurs de virulence et formation de biofilm par *S. epidermidis* et *S. aureus*

#### i. Facteurs de virulence

Les adhésines polysaccharidiques intercellulaire (PIA) et adhésine polysaccharidique capsulaire (PSA) produites par *S. epidermidis* permettent l'adhérence initiale, l'adhésion interbactérienne et facilitent la formation du biofilm (Fey & Olson, 2010 ; Cheung *et al.*, 2014). L'acide poly- $\gamma$ -glutamique facilite la croissance et la survie de *S. epidermidis* sur la peau puisqu'il protège la bactérie contre les AMP et neutrophiles de l'hôte (Kocianova *et al.*, 2005). *S. epidermidis* sécrète également des PSM (PSMa1-4, PSM $\beta$ 1 et PSM $\beta$ 2, PSM $\delta$  et PSM $\gamma$ ) possédant une activité cytolytique modérée dirigée contre les neutrophiles et exerçant une activité pro-inflammatoire (Cheung *et al.*, 2014 ; Otto, 2014). Ces composés sont les principaux facteurs de virulence de *S. epidermidis*.



Dans la DA, les protéases exogènes de *S. aureus* perturbent la barrière cutanée (Hirasawa *et al.*, 2010 ; Sonesson *et al.*, 2017), inactivent les AMP (Wang *et al.*, 2017) et facilitent ainsi la pénétration de superantigènes qui induisent par la suite une réponse inflammatoire excessive *via* une suractivation de LT et une libération excessive de cytokines (Lehmann *et al.*, 2004 ; Nada *et al.*, 2012 ; Na *et al.*, 2012). *S. aureus* produit également des  $\alpha$ -toxines, formant des pores dans la membrane cytoplasmique de cellules cibles comme les kératinocytes ou les lymphocytes et aboutit donc à leur lyse (Breuer *et al.*, 2005 ; Brauweiler *et al.*, 2013, 2014). Elle produit aussi des  $\delta$ -toxines (ou PSM $\gamma$ ) induisant une réaction allergique (Nakamura *et al.*, 2013). La protéine A produite par *S. aureus* contribue à l'inflammation cutanée *via* sa liaison et l'activation au récepteur 1 du TNF des kératinocytes (Gómez *et al.*, 2004 ; Classen *et al.*, 2011 ; Jun *et al.*, 2017).

### ii. Biofilm

*S. aureus* avec 100% de ces isolats et *S. epidermidis* avec 75% de ces isolats ont une grande capacité de formation de biofilms dans la DA (Allen & Mueller, 2011 ; Allen *et al.*, 2014). Des **biofilms multi-espèces mixtes** de *S. aureus* et *S. epidermidis* prévalent dans la maladie et influencent la sévérité de la DA (Gonzalez *et al.*, 2017), sous forme de biofilms multicouches entre la couche cornée, la glande sébacée et les follicules pileux (Costerton *et al.*, 2003).

La formation de biofilm par *S. epidermidis* et *S. aureus* requiert l'adhésion des bactéries aux protéines de la MEC cutanée, adhésion médiée par les MSCRAMM. Le gène *embp*, indispensable à l'adhésion et la formation du biofilm, est distribué de la même manière chez les souches commensales et pathogènes de *S. epidermidis* (Mekni *et al.*, 2012). L'agrégation intercellulaire des staphylocoques chez *S. aureus* et *S. epidermidis* est assurée par trois composés principaux :

- La PIA, exopolysaccharide, codée par l'opéron *icaADBC* chez *S. epidermidis* et *S. aureus*. Certaines souches commensales de *S. epidermidis* ne codent pas pour l'opéron *icaADBC*, ce qui met en évidence son importance dans la virulence de *S. epidermidis* (Li *et al.*, 2005). La PIA protège également *S. epidermidis* des neutrophiles et des AMP (Otto, 2009).
- La protéine associée à l'accumulation (Aap), extracellulaire, décrite chez *S. epidermidis* (Sun *et al.*, 2005), impliquée dans l'accumulation cellulaire en biofilm (Rohde *et al.*, 2005).
- La protéine associée au biofilm (Bap), associée à la paroi cellulaire chez *S. aureus* (Cucarella *et al.*, 2001) et la protéine homologue associée au biofilm (Bhp) chez *S. epidermidis* (Heilmann, 2011).

Le QS connu des staphylocoques comme *S. epidermidis* et *S. aureus* est médié par des peptides, modifiés post-traduction, contenant une structure thiolactone, générés par le système Accessory gene regulator (Agr). L'opéron *agr* régule la formation de biofilm (épaisseur et structure) *via* la régulation de l'expression de l'autolysine AtlE et PSM (incluant la  $\delta$ -toxine) (Kong *et al.*, 2006).

Les biofilms de *S. aureus* et *S. epidermidis* dans les lésions cutanées de DA, formeraient alors des occlusions au niveau des canaux sudoripares dues à la présence d'eau et de sel, et ainsi influenceraient la sévérité de la pathologie (Allen *et al.*, 2014 ; Gonzalez *et al.*, 2017). Les rôles de *S. aureus* et potentiellement *S. epidermidis* comme cause de la DA restent à déterminer.

Ainsi, en raison de la variabilité inter-individuelle et intra-individuelle et des multiples facteurs affectant le microbiote cutané, la définition précise d'un microbiote sain est difficile (Sfriso *et al.*, 2019). Cependant, parmi cette variabilité, il semble clair que les commensaux *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes* sont trois bactéries fortement réparties au sein des couches cutanées qui occupent des rôles importants. Le maintien de leur abondance relative pourrait être un facteur clé de l'homéostasie cutanée car ils peuvent devenir des agents pathogènes opportunistes lors de conditions cutanées altérées (Christensen *et al.*, 2016). Par conséquent, les biofilms, facteurs de virulence et le QS de souches virulentes de ces bactéries sont des cibles intéressantes puisque ces souches, sous leurs formes pathogènes, sont impliquées dans des pathologies cutanées courantes comme l'acné ou la dermatite atopique.





# Objectifs de thèse



## Objectifs de thèse

En France et, plus particulièrement en Bretagne, l'algue *Ulva* sp. prolifère et s'échoue sur le littoral sous la forme de marées vertes qui sont nuisibles pour l'environnement, l'économie de la région notamment touristique mais aussi sur la santé humaine lorsque l'algue se décompose. Le ramassage de cette algue représente un coût important pour les communes et, malheureusement, cette algue n'est à l'heure actuelle que faiblement valorisée (alimentation humaine, déchet, épandage, etc.). Toutefois, des études ont mis en évidence que les ulvanes, polysaccharides matriciels sulfatés majoritaires de l'algue *Ulva* sp., présentent des activités biologiques, notamment au niveau des fibroblastes dermiques humains, potentiellement valorisables en tant que bioactifs de haute valeur ajoutée.

Les objectifs de ces travaux de thèse sont d'utiliser un procédé innovant écoresponsable, l'Extraction Assistée par Enzyme (EAE), afin de produire des fractions enrichies en poly- et oligosaccharides sulfatés de l'algue verte *Ulva* sp., et de rechercher les activités biologiques potentielles de ces fractions sur le système cutané à des fins d'applications potentielles dans le domaine de la dermo-cosmétique. Ainsi, les effets de ces fractions sur des composants constitutifs du système cutané sont investigués au niveau dermique afin de mettre en évidence leur rôle dans des stratégies de réparation tissulaire ou anti-vieillessement. Les activités de ces fractions sont également évaluées sur des bactéries du microbiote cutané, impliquées dans le maintien de l'homéostasie cutanée, afin de mettre en évidence leurs effets sur la croissance et la virulence bactérienne, et leur potentiel rôle dans une stratégie anti-inflammatoire.

Un autre objectif fondamental de ces travaux est d'élucider un lien entre la structure et la fonction biologique des fractions d'ulvanes de composition et poids moléculaires différents issues d'*Ulva* sp. via l'utilisation de différents procédés de purification et de dépolymérisation.

La première partie de ce travail a pour objectif de présenter les résultats de l'EAE en comparaison avec le procédé de macération pour la production de fractions riches en ulvanes, la purification et la dépolymérisation de ces fractions ainsi que leur caractérisation biochimique. Dans la suite du manuscrit, et par souci de simplification, les fractions riches en ulvanes sont nommées, selon leurs poids moléculaires : « fractions d'ulvanes » ou « fractions d'oligo-ulvanes ». Des évaluations de bioactivités *in vitro* de ces fractions en ciblant un potentiel anti-vieillessement, antioxydant ou anti-inflammatoire ont été investiguées par des tests biochimiques.

La seconde partie présente les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues d'*Ulva* sp. par EAE et macération sur l'activité cellulaire des fibroblastes dermiques humains, et sur le métabolisme de la matrice extracellulaire (MEC) synthétisée par les fibroblastes. Pour cela, la voie anabolique a été étudiée via l'évaluation de la synthèse des composants de la MEC, collagènes et glycosaminoglycanes. L'expression des collagènes de type I et III a été étudiée au niveau transcriptionnel et protéique.

L'expression et l'activité de la MMP-1, enzyme régulant la synthèse de collagène de type I, a été évaluée au niveau transcriptionnel et protéique dans le but d'analyser la voie catabolique de la MEC.

L'expression du TIMP-1, inhibiteur de la MMP-1, a également été mesurée au niveau transcriptomique et protéomique.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'étude préliminaire de l'implication de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ , impliquée dans la stimulation de la synthèse de collagène type I, *via* l'étude au niveau transcriptionnel de son expression ainsi que celle des SMAD. Nous avons également étudié de façon préliminaire la voie NF- $\kappa$ B, impliquée dans les phénomènes pro-inflammatoires et de régulation de l'expression du collagène de type I et de la MMP-1, *via* l'étude du niveau moyen d'expression des ARNm de *p65*, sous-unité principalement impliquée.

Dans la troisième partie, les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues d'*Ulva* sp. par EAE ont été étudiés sur le microbiote cutané et plus particulièrement sur les espèces bactériennes *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Cutibacterium acnes*. Plus spécifiquement, l'étude de l'impact des fractions sur leur croissance bactérienne, leur activité de formation de biofilm, et leur potentiel cytotoxique ou inflammatoire sur les kératinocytes est réalisée.

# **Chapitre 2**

## **Matériels et méthodes**





## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

### I. Récolte, extraction, purification et dépolymérisation de la matière algale *Ulva* sp.

#### A. Collecte et traitement d' *Ulva* sp.

La récolte d' *Ulva* sp. a été réalisée à marée basse descendante le 28 mai 2018 sur la plage de Landrézac à Sarzeau (47°30'17.9"N 2°42'37.1"O) dans le Morbihan en Bretagne. Les algues collectées sont issues d'échouage au sein du rideau d'eau. Les algues sont ensuite lavées à l'eau du robinet afin d'éliminer les sédiments et les épiphytes présents. Une fois lavées, elles sont égouttées et séchées sur pailleasse à l'air libre (18 – 22°C) pendant une nuit (Figure 57A). Les algues sont broyées à l'aide d'un hachoir (JUPITER T8) en particules de 3 mm de diamètre (Figure 57B et C), lyophilisées (Alpha 1-4 -55°C CHRIST) (Figure 57D) et stockées à l'obscurité à Température Ambiante (TA) : 18 – 22°C.

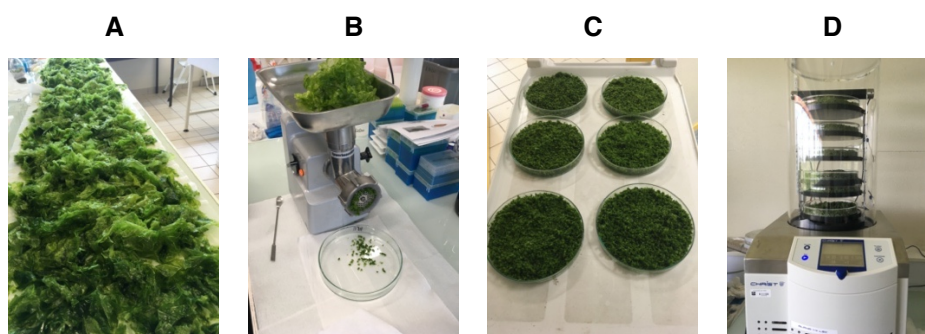


Figure 57 : Prétraitement des algues

A : Lavage et séchage des algues ; B : Broyage ; C : Mise en plaques avant congélation ; D : Lyophilisation.

#### B. Procédés d'extraction et de purification des ulvanes

##### 1. Protocoles d'extraction et de précipitation des ulvanes

La matière sèche d' *Ulva* sp. est soumise à deux procédés d'extraction distincts dans des réacteurs (Mac Technologie) : l'extraction classique par **Macération** (M) et par **Extraction Assistée par Enzyme** (EAE) (Figure 58, p. 136).

###### a) Macération

Trente-trois grammes de poudre d'algues sont introduits dans 800 ml d'eau distillée et incubés pendant 2 h à 90°C sous agitation continue à 300 – 500 rpm dans des réacteurs (Lahaye & Robic, 2007). Le mélange est ensuite filtré sur Büchner afin d'éliminer les résidus algaux.

###### b) Extraction Assistée par Enzyme (EAE)

Protamex® est un complexe multi-enzymatique possédant des activités subtilisine (alcaline) (EC 3.4.21.62) et endo-protéase (neutre) (EC 3.4.24.28).



**Figure 58 : Montage en série de réacteurs (Mac Technologie) pour l'extraction par macération ou par EAE**

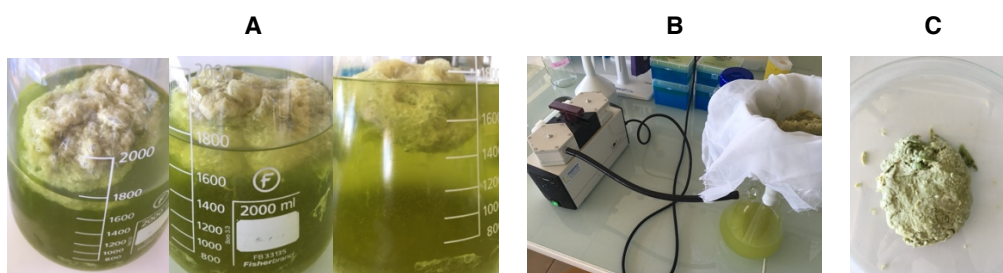
La préparation enzymatique contient 9% d'endo-protéase neutre, 1% d'endopeptidase alcaline, 89% de chlorure de sodium et 1% d'eau. Ces enzymes sont isolées à partir d'une souche bactérienne de *Bacillus* sp..

L'activité optimale de Protamex® est atteinte pour des températures comprises entre 35 et 60°C et aux pH de 5,5 à 7,5. L'activité déclarée par le fabricant Novozymes est de 1,5 AU-N/g (« Activity Unit-Nitrogen », quantité d'enzyme capable de libérer une mole d'azote par minute).

L'enzyme Protamex® est introduite à hauteur de 6% de la matière sèche algale (soit 1,98 g de préparation enzymatique commerciale) dans les 800 ml d'eau distillée chauffés au préalable à 50°C. Une fois la solution enzymatique à 50°C, trente-trois grammes de matière algale sont ajoutés. L'EAE est réalisée pendant 3 h à 50°C sous agitation continue à 300 – 500 rpm. L'EAE est stoppée par inactivation de l'enzyme pendant 15 min à 90°C (dénaturation de l'enzyme) (Hardouin *et al.*, 2014b). Le mélange est ensuite filtré sur Büchner afin d'éliminer les résidus algaux.

### c) Précipitation polysaccharidique

Les extraits aqueux obtenus à la suite de la macération ou de l'EAE sont soumis à une précipitation éthanolique (1 : 5, (v/v)) avec de l'éthanol absolu (> 99%, Fisher Chemical) pendant 24 h à 4°C. Après filtration sur Büchner, les précipités sont lyophilisés et conservés à 4°C (UM pour la fraction polysaccharidique enrichie en ulvanes bruts obtenue par macération et UE pour celle par EAE) (Figure 59).



**Figure 59 : Étapes de la précipitation polysaccharidique**

**A** : Précipité polysaccharidique en suspension ; **B** : Filtration sur Büchner ; **C** : Extrait brut avant lyophilisation.

## 2. Procédés de purification des ulvanes

Les séries de procédés d'extraction de l'algue *Ulva* sp. (macération ou EAE), de production des ulvanes bruts, et de purification appliqués aux ulvanes bruts (précipitation éthanolique, dialyse ou saturation au sulfate d'ammonium suivie de précipitation éthanolique et dialyse) sont schématisées sur la Figure 60 et sur l'intercalaire joint.

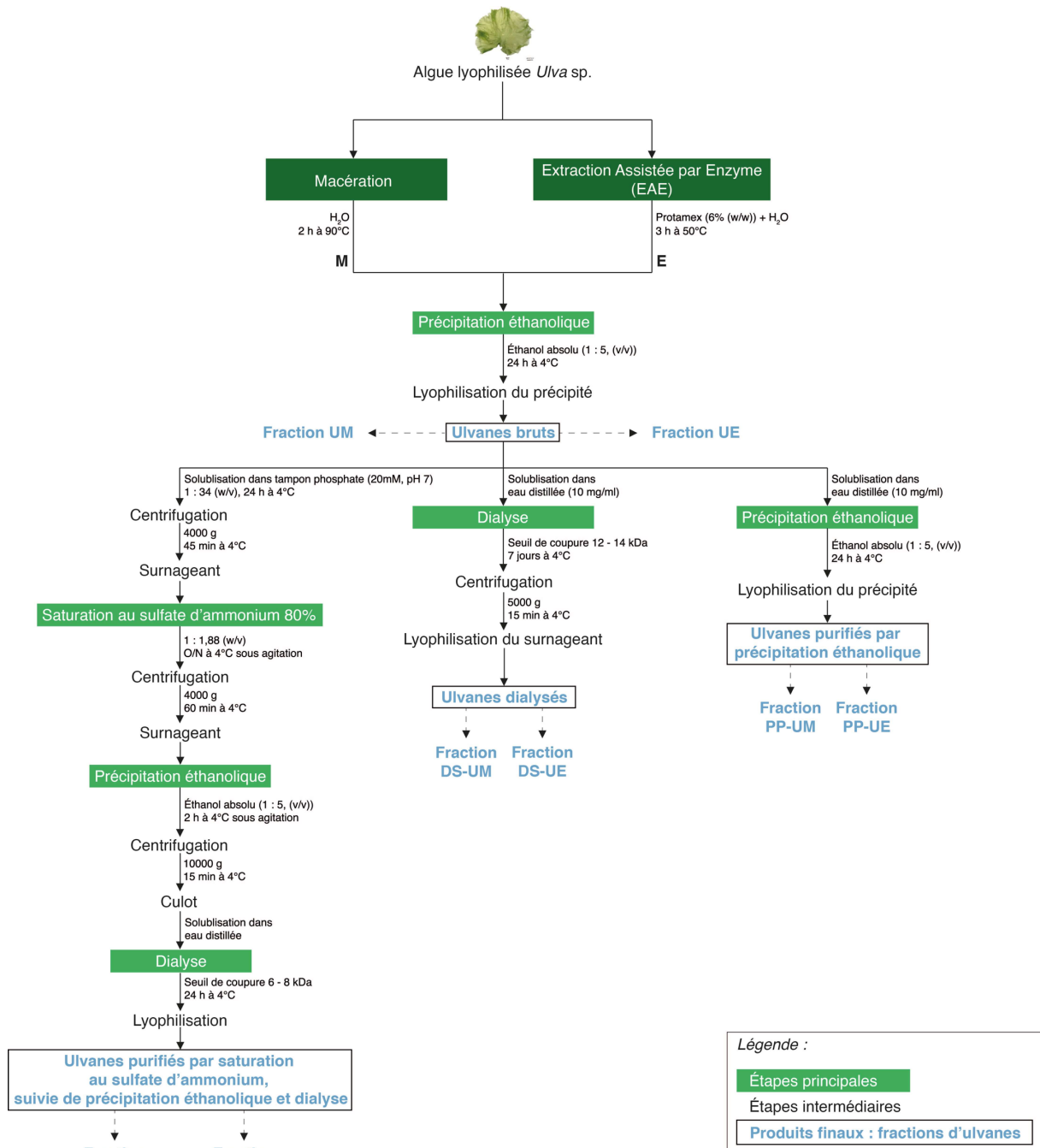


Figure 60 : Série de procédés d'extraction et de purification des ulvanes à partir de la macroalgue *Ulva* sp.

### a) Précipitation éthanolique

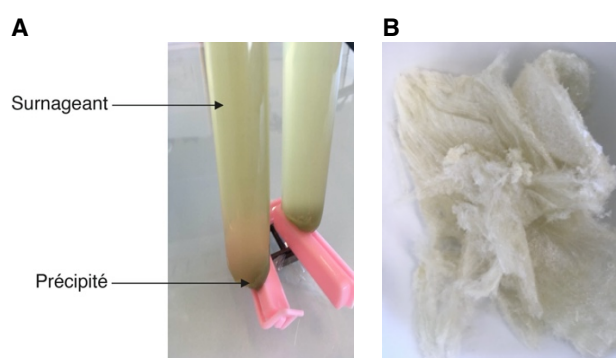
Les fractions d'ulvanes bruts (UM et UE) sont solubilisées dans de l'eau distillée à 10 mg/ml et soumises à une nouvelle précipitation éthanolique (1 : 5, (v/v)) avec de l'éthanol absolu pendant 24 h à 4°C. Après filtration sur Büchner, les précipités sont lyophilisés et conservés à 4°C (**PP-UM** pour la fraction obtenue par macération et **PP-UE** pour celle par EAE).

Ces deux fractions seront utilisées pour les réactions de dépolymérisation (§ B.3., p. 139).

### b) Procédés de dialyse

Afin d'éliminer les sels, les fractions UM et UE, solubilisées dans de l'eau distillée à 10 mg/ml, sont dialysées pendant 7 jours contre de l'eau distillée (seuil de coupure 12 – 14 kDa, Spectra/Por®4 Dialysis Membrane, Spectrum Laboratories) en remplaçant l'eau deux fois toutes les 24 h pendant les trois premiers jours puis une fois toutes les 24 h les quatre derniers jours. Le retentât est centrifugé à 5000 g pendant 15 min à 4°C (Avanti J-30 I Centrifuge, Beckman) afin d'éliminer d'éventuelles particules en suspension.

Les précipités obtenus ne sont pas utilisés en raison de leur forte hydrophobicité. Les surnageants sont lyophilisés et conservés à 4°C (DS-UM pour celui issu de macération et DS-UE pour celui issu d'EAE) (Figure 61).



**Figure 61 : Étapes de la dialyse des solutions polysaccharidiques**  
**A** : Boudin de dialyse ; **B** : Surnageant lyophilisé (DS).

### c) Précipitation au sulfate d'ammonium suivie de précipitation éthanolique et dialyse

La saturation au sulfate d'ammonium est un procédé classiquement utilisé après extraction aqueuse pour l'extraction de protéines algales (Suresh Kumar *et al.*, 2014 ; Wingfield, 2016 ; Harrysson *et al.*, 2018 ; Kazir *et al.*, 2019). Ici, la saturation au sulfate d'ammonium est utilisée comme procédé d'élimination des protéines co-extraites contenues dans les fractions d'ulvanes bruts (UM et UE).

La récupération des sucres est effectuée par la suite *via* une précipitation éthanolique.

Un gramme d'extrait est dissous dans 34 ml de tampon phosphate (20 mM, pH 7) pendant 24 h sous agitation continue à 4°C. Les solutions sont ensuite centrifugées 45 min à 4000 g à 4°C (Avanti J-30 I Centrifuge, Beckman). Le surnageant est collecté et le culot est remis en suspension dans le tampon phosphate (20 mM, pH 7) afin de réitérer l'étape précédente (1 : 34, (w/v)). Après centrifugation, les surnageants sont rassemblés et le sulfate d'ammonium est ajouté (saturation à 80%, 1 : 1,88 (w/v)). La solution est agitée de façon continue pendant une nuit à 4°C, puis centrifugée 1 h à 4000 g à 4°C (Adrien, 2016).

Le précipité n'est pas utilisé en raison de la forte hydrophobicité. Le surnageant est collecté pour une précipitation des polysaccharides avec de l'éthanol absolu (1 : 5, (v/v)) pendant 2 h à 4°C sous agitation continue. La solution est ensuite centrifugée à 10000 g pendant 15 min à 4°C. Le culot est dissous dans de l'eau distillée et dialysé 72 h à 4°C, en remplaçant l'eau deux fois toutes les 24 h (seuil de coupure 6 – 8 kDa, Spectra/Por®1) (Adrien, 2016), lyophilisé et stocké à 4°C (AS-PP-DS-UM pour la fraction obtenue par macération et AS-PP-DS-UE pour celle par EAE).

### 3. Comparaison de deux procédés de dépolymérisation des ulvanes

Les deux séries de procédés de dépolymérisation chimique évaluées : acide par résine acide échangeuse d'ions ou radicalaire par le peroxyde d'hydrogène, sont représentées sur la Figure 62 et l'intercalaire joint.

La dépolymérisation a pour objectif la production d'ulvanes de bas poids moléculaires potentiellement plus bioactifs.

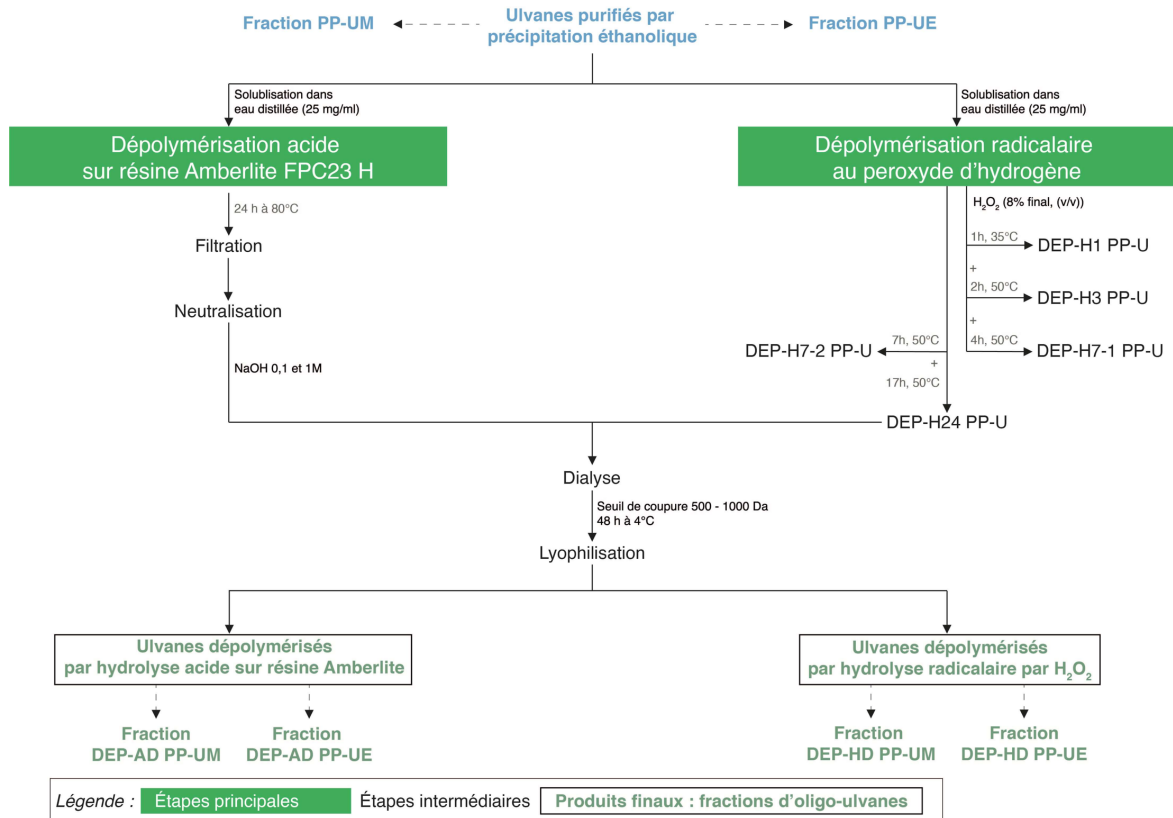


Figure 62 : Série de procédés détaillés de dépolymérisation utilisant la résine Amberlite (AD) ou le peroxyde d'hydrogène (HD)

#### a) La dépolymérisation acide par résine échangeuse d'ions Amberlite FPC23 H

La résine Amberlite FPC23 H<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich), acide forte, est utilisée pour la dépolymérisation de polysaccharides (Adrien *et al.*, 2017b). Des solutions enrichies en polysaccharides, PP-UM et PP-UE (100 ml à 25 mg/ml) sont chauffées séparément à 80°C. La résine Amberlite (10 ml) est ajoutée à chaque solution. La dépolymérisation est effectuée sous agitation pendant 24 h à 80°C. Après refroidissement, les solutions sont filtrées et neutralisées avec de la soude (NaOH) 1 et 0,1 M. Les solutions sont ensuite dialysées pendant 48 h contre de l'eau distillée, en remplaçant l'eau deux fois toutes les 24 h (seuil de coupure de 500 – 1000 Da, tube Biotech CE, Spectra/Por<sup>®</sup>), puis lyophilisées et stockées à 4°C.

#### b) La dépolymérisation radicalaire par le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (100 volumes > 30%, Fisher Scientific) est utilisé pour la dépolymérisation d'extraits riches en polysaccharides (Pengzhan *et al.*, 2004 ; Qi *et al.*, 2005a).

Les fractions enrichies en polysaccharides, PP-UM et PP-UE, sont préparées à la concentration de 25 mg/ml dans de l'eau distillée. Du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% (w/w), Fisher Scientific) est ajouté (8%, (v/v)) à la solution et le mélange est chauffé sous agitation continue (35 ou 50°C). Des aliquots sont collectés à différentes heures et températures d'expérimentation, lyophilisés et stockés à 4°C. Certaines fractions, après dépolymérisation, sont dialysées 48 h contre de l'eau distillée, en remplaçant l'eau deux fois toutes les 24 h (seuil de coupure de 500 - 1000 Da, tube Biotech CE, Spectra/Por®), lyophilisées et stockées à 4°C.

## II. Méthodes d'analyses de la composition biochimique

### A. Analyse de la composition biochimique par dosages

---

#### 1. Détermination du taux de matière minérale

Le taux de matière minérale est déterminé par une méthode de calcination avec la mesure de la perte de masse des échantillons. Pour cela, les échantillons lyophilisés (50 à 100 mg) sont déposés dans des creusets en porcelaine et sont ensuite séchés à l'étuve 40 min à 100°C. Puis, ils sont passés à la flamme du bec Bunsen et placés 2 h dans un four à moufle à 585°C (Carbolites, Furnaces CSF, UK).

#### 2. Extractions préliminaires à l'acide et à l'eau

Les fractions produites (brutes, purifiées et dépolymérisées) sont soumises à une hydrolyse acide et une hydrolyse aqueuse pour l'analyse de la composition biochimique.

Chaque extraction est réalisée en triplicat.

**Hydrolyse aqueuse :** 10 mg de matière lyophilisée finement broyée sont ajoutés dans 5 ml d'eau ultrapure. Le mélange est incubé 2 h à 100°C dans un bloc chauffant et agité manuellement toutes les 30 min. Une solution de concentration finale de 1 mg/ml est obtenue en ajoutant 5 ml d'eau ultrapure. Cette solution aqueuse est utilisée pour le dosage des groupements sulfates.

**Hydrolyse acide :** 10 mg de matière lyophilisée finement broyée sont ajoutés dans 5 ml d'acide chlorhydrique (HCl) 1 M. Le mélange est incubé 2 h à 100°C dans un bloc chauffant et agité manuellement toutes les 30 minutes. Le mélange est neutralisé par ajout de 5 ml de NaOH 1 M. La concentration finale est de 1 mg/ml. Cette solution est utilisée pour le dosage des sucres totaux, acides uroniques et protéines.

#### 3. Dosage colorimétrique des groupements sulfates

La teneur en sulfates, liés aux polysaccharides, est déterminée par l'utilisation de la méthode colorimétrique décrite par Jaques *et al.* (1968). En milieu aqueux, les groupements sulfates sont complexés par le 3,7-bis (diméthylamino)-1,9-diméthylphénothiazin-5-ium chloride (Azure A).



Cette réaction aboutit à la formation d'un chromophore de couleur violette absorbant à la longueur d'onde de 535 nm (Figure 63).

Dans une microplaque 96 puits, 20 µl d'échantillon à une concentration déterminée sont mélangés avec 200 µl de solution aqueuse d'Azure A à 10 mg/L (Sigma-Aldrich). Une gamme étalon de 0 à 50 µg/ml est réalisée avec le dextran sulfaté à 17% (Sigma-Aldrich). La lecture de l'absorbance est mesurée à 535 nm avec un lecteur de microplaques (Thermo scientific, Multiskan TM GO).

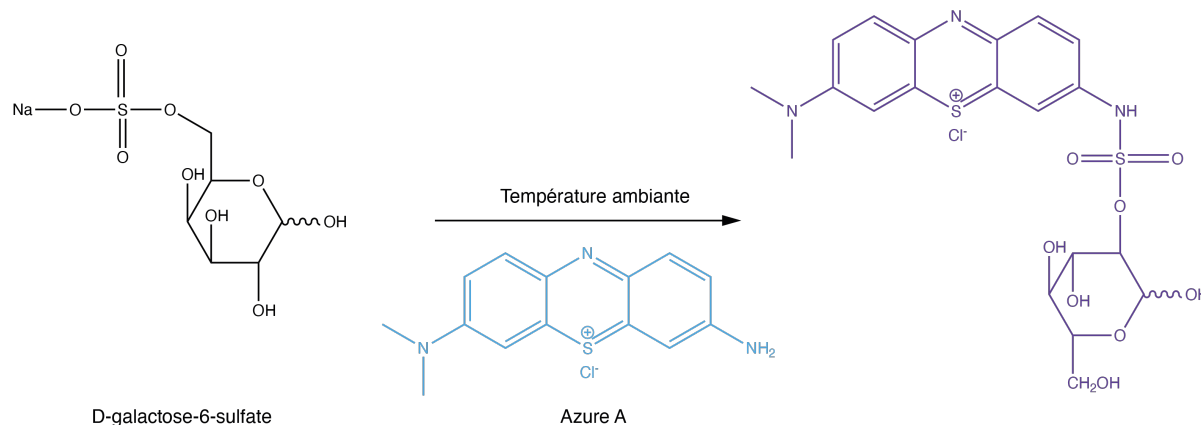


Figure 63 : Réaction du dosage des groupements sulfates, liés aux polysaccharides, par la méthode de Jaques *et al.* (1968)

#### 4. Dosage colorimétrique des sucres totaux

Le principe du dosage des sucres totaux est basé sur la réaction de complexation entre les dérivés du furfural et le phénol par la méthode de Dubois *et al.* (1956). Sous l'action d'acides minéraux concentrés à chaud, les oses (hexoses ou pentoses) subissent une déshydratation et une cyclisation formant des dérivés du furfural comme le 5-hydroxyméthylfurfural. L'ajout de phénol en solution entraîne une réaction de condensation entre deux molécules de phénol et ces dérivés de furfural. Un complexe jaune/orange est ainsi formé (Figure 64). L'intensité de la coloration, dépendante de la concentration en complexe, est mesurée à 485 nm par spectrophotométrie.

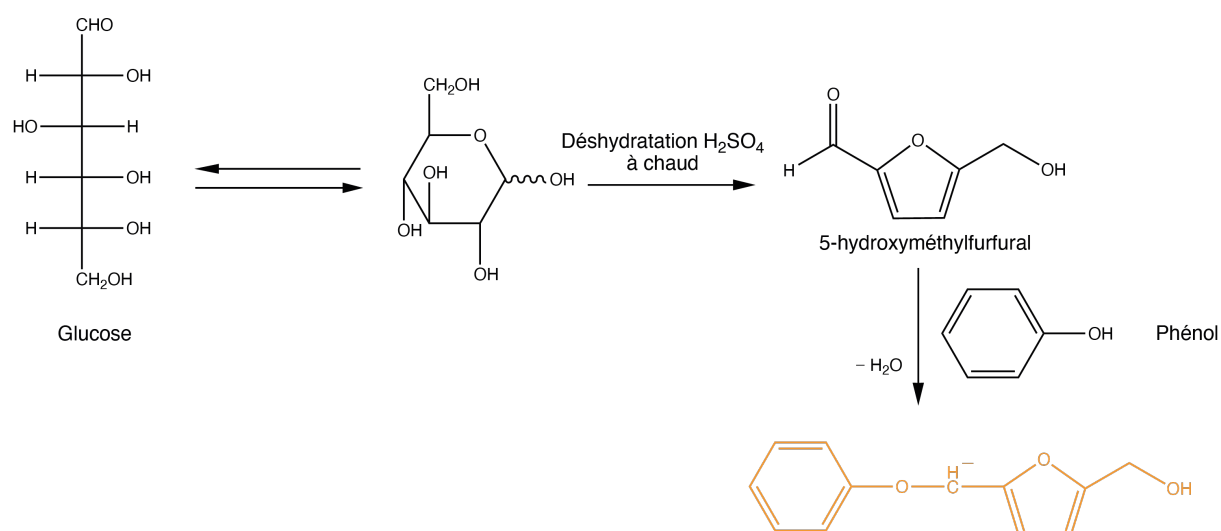
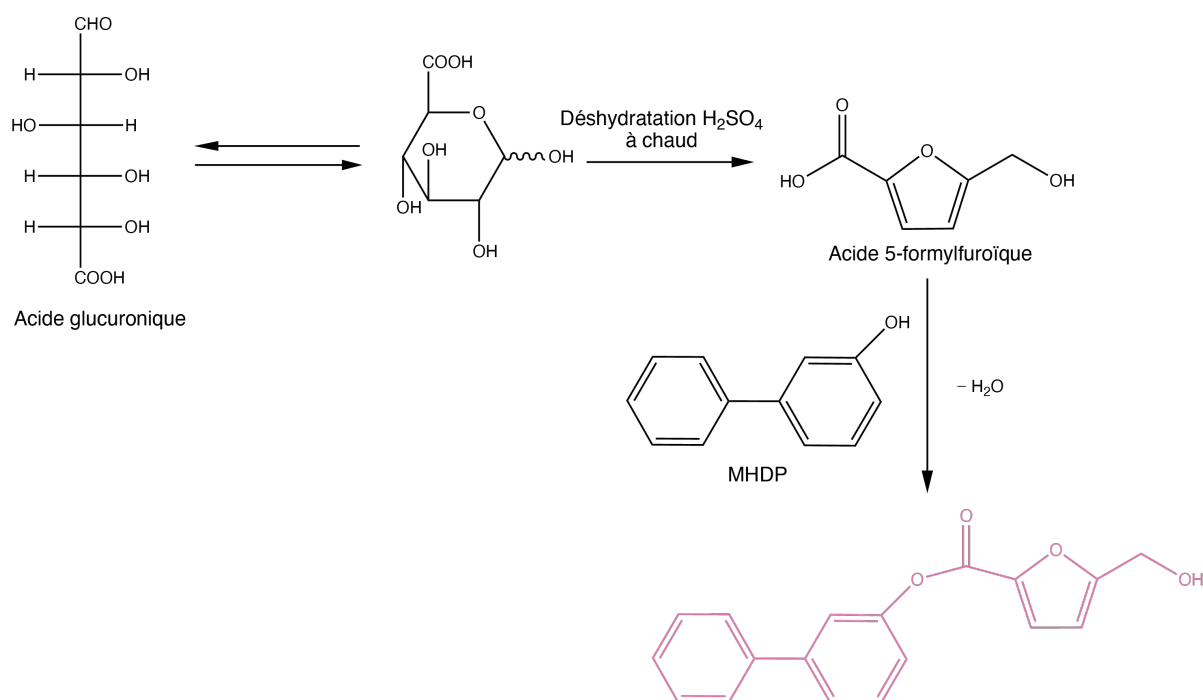


Figure 64 : Réaction du dosage des sucres totaux par la méthode de Dubois *et al.* (1956)

Dans un tube à hémolyse en verre, 500 µl d'échantillon à une concentration déterminée sont introduits. Sous hotte chimique, 25 µl de phénol à 75% (w/v) (Fisher Chemical) sont ajoutés puis le mélange est homogénéisé en vortexant. Un volume de 1,3 ml d'acide sulfurique 96% (w/w) concentré (Acros Organics) est ajouté. La réaction étant exothermique, le mélange est refroidi dans la glace pendant 5 min, puis incubé 10 min au bain-marie à 30°C. Après incubation, 200 µl du mélange sont déposés en triplicat sur une microplaque en quartz (QG Hellma). L'absorbance est mesurée à 485 nm (Thermo scientific, Multiskan TM GO). Une courbe d'étalonnage de glucose de 0 à 100 µg/ml (Fisher Chemical) est réalisée.

## 5. Dosage colorimétrique des acides uroniques

Le dosage des acides uroniques est réalisé selon la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) modifiée par Filisetti-Cozzi et Carpita (1991). Sous l'action d'acide fort concentré à chaud, les acides uroniques subissent une déshydratation puis une cyclisation. Des dérivés d'acide 5-formylfuroïque se forment. Ces dérivés au contact du Méta-HydroxyDiPhényle (MHDP) forment un chromophore de couleur rose absorbant à la longueur d'onde de 525 nm (Figure 65). La coloration est plus vive en présence de borate mais reste très sensible aux interférences dues aux sucres neutres qui se colorent également en présence d'acide sulfurique concentré. Du sulfamate de potassium est ainsi ajouté afin de limiter ces interférences.



**Figure 65 : Réaction du dosage des acides uroniques par la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) modifiée par Filisetti-Cozzi et Carpita (1991)**

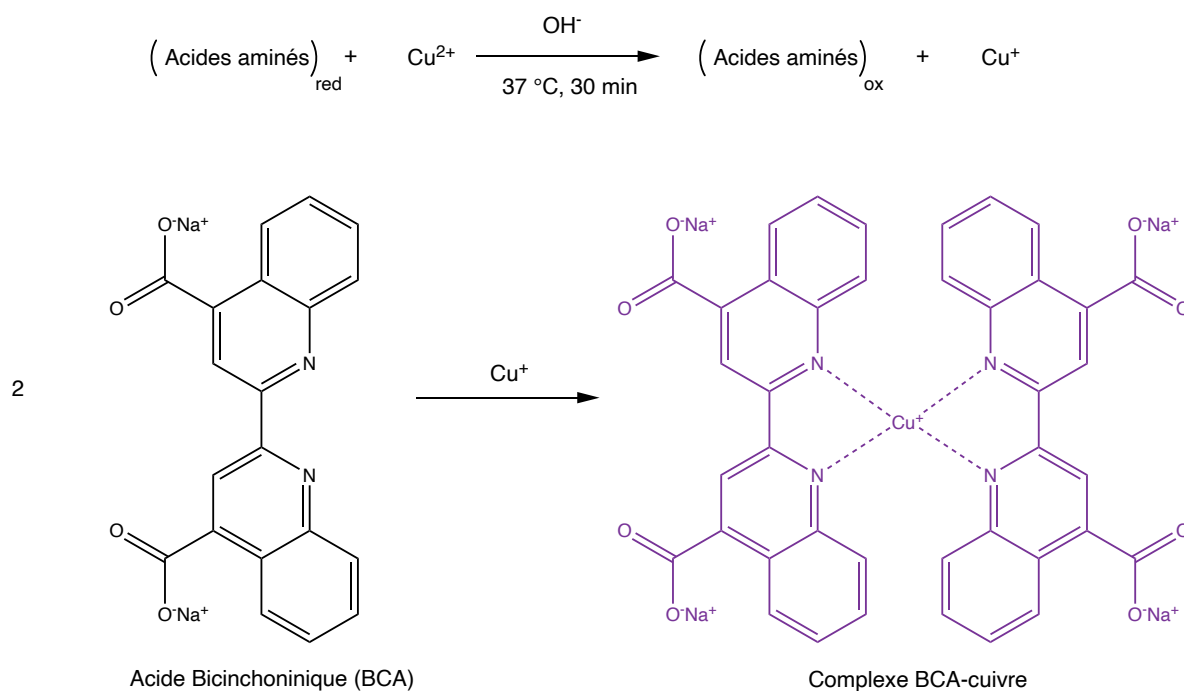
Dans un tube à hémolyse en verre, 500 µl d'échantillon à une concentration déterminée sont introduits. Ensuite, 20 µl de sulfamate de potassium 4 M (98% (w/w), Alfa Aesar) sont ajoutés. Après agitation du mélange sous vortex, 1,2 ml de solution de tétraborate de sodium (Alfa Aesar) (75 M dans de l'acide sulfurique 96% (w/w), Fisher Chemical) sont ajoutés avec précaution.



Les tubes sont mis à incuber pendant 20 min à 80°C et refroidis rapidement dans de la glace pendant 5 min. Puis, 80 µl de solution aqueuse de MHDP à 0,15% (w/v) (Acros Organics) dans de l'hydroxyde de sodium 0,5% (v/v) (Fisher Chemical) sont introduits. Une agitation sous vortex est réalisée et la réaction évolue pendant 10 min à TA. 200 µl de mélange sont déposés en triplicat sur une microplaque en quartz (QG Hellma). L'absorbance est mesurée à 525 nm (Thermo scientific, Multiskan TM GO). Une gamme étalon d'acide glucuronique de 0 à 100 µg/ml (Acros Organics) est réalisée au cours de chaque analyse.

## 6. Dosage colorimétrique des protéines

Le dosage des protéines totales est réalisé selon la méthode de Smith *et al.* (1985) (Figure 66). Ce dosage est basé sur la réaction du Biuret qui se traduit par la réduction des ions  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  par les protéines en milieu alcalin. Les ions  $\text{Cu}^+$  sont ensuite chélatés par le 4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinoline (Acide BiCinchoninique, BCA) pour former un chromophore violet absorbant à la longueur d'onde de 562 nm.



**Figure 66 : Réaction du dosage des protéines par la méthode de Smith *et al.* (1985)**

Sur une microplaque 96 puits, 25 µl d'échantillon à une concentration déterminée sont introduits en triplicat. Puis 200 µl de réactif du kit « Pierce BCA Protein Assay » (Thermo Scientific) sont ajoutés. La microplaque est incubée à 37°C pendant 30 minutes avant lecture de l'absorbance à 562 nm dans le lecteur de microplaques (Thermo scientific, Multiskan TM GO). Une gamme étalon de BSA (albumine de sérum bovin) du « Pierce BCA Protein Assay Kit » de 0 à 250 µg/ml est réalisée au cours de chaque dosage.

## B. Analyses par systèmes chromatographiques et spectrométriques

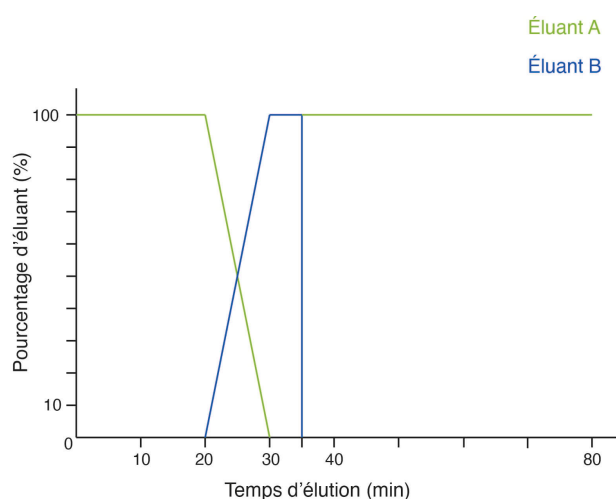
---

### 1. Profil des monosaccharides déterminé par Chromatographie Haute Performance Échangeuse d'Anions couplée à un Détecteur par Ampérométrie Pulsée (HPAEC-PAD)

L'analyse en monosaccharides des fractions est réalisée par un système de chromatographie liquide à haute performance échangeuse d'anions lié à un détecteur ampérométrique pulsé (« High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection », HPAEC-PAD).

Le système (Dionex ICS-5000+ DC) se constitue d'une colonne de garde (CarboPac Guard Column, 4 x 60 mm, Dionex™) et d'une colonne échangeuse d'ions (CarboPac™ PA1, 4 x 250 mm, Dionex™). La colonne CarboPac™ PA1 se compose d'une phase stationnaire échangeuse d'anions avec une résine constituée d'un substrat de polystyrène/divinylbenzène sulfoné en surface de 10 µm de diamètre aggloméré avec des microbilles de latex de 350 nm (Dionex MicroBead) portant des fonctions ammoniums quaternaires. La fixation s'effectue *via* les interactions entre les fonctions SO<sub>3</sub><sup>-</sup> du substrat et les fonctions ammoniums des microbilles de latex. La séparation des monosaccharides est basée sur le nombre et la position de leurs groupements hydroxyles. Les microbilles de la colonne étant chargées positivement, les groupements hydroxyles des monosaccharides vont donc interagir avec celles-ci. Lorsque le pH devient basique (éluant NaOH utilisé), cela entraîne un échange d'anions avec les monosaccharides. Plus les monosaccharides ont un pKa élevé, moins ils interagissent avec la phase stationnaire de la colonne et donc plus vite ils sont élués. Le détecteur ampérométrique pulsé (PAD) détecte et quantifie les monosaccharides en sortie de colonne. La détection est réalisée par la mesure d'un courant électrique (0,10 volts) généré par la réduction des groupements hydroxyles des monosaccharides lors de leur passage en surface de l'électrode d'or.

Avant analyse, 1 ml d'échantillon (2 mg/ml dans eau ultrapure) est introduit avec 110 µl d'HCl 1 M (Fisher Chemical) dans des ampoules qui sont ensuite scellées à la flamme. Les échantillons sont hydrolysés 48 h à 100°C dans un bloc chauffant. Après hydrolyse, les échantillons sont neutralisés par ajout de 110 µl de NaOH 1 M (Fisher Chemical). 100 µl d'une solution de déoxyribose à 1000 ppm et 680 µl d'eau ultrapure sont finalement ajoutés dans l'ampoule. Pour la calibration, les standards de monosaccharides purs utilisés sont le rhamnose, le glucosamine, le galactose, le mannose, le fructose (mélange A) et l'arabinose, le glucose, le xylose, le ribose et l'acide glucuronique (mélange B) (Fisher Chemical, Sigma-Aldrich et Acros Organics). Les deux mélanges de standards sont préparés aux concentrations de 125 à 0,1 ppm par des dilutions en cascade. Le déoxyribose est utilisé comme étalon interne dans chaque échantillon à la concentration finale de 50 ppm. Les standards et échantillons sont filtrés à 0,45 µm à l'aide de filtres PVDF (« PolyVinylidene Fluoride ») hydrophiles (Millex-HV, Merck).



**Figure 67 : Programme d'élution appliqué au niveau du système HPAEC-PAD pour l'analyse en monosaccharides**

25  $\mu$ l d'échantillon sont injectés dans le système chromatographique. L'élution est réalisée à un débit de 1 ml/min par deux éluants : éluant A (18/82 NaOH 0,1 M/H<sub>2</sub>O) et éluant B (NaOAc 1 M/NaOH 0,1 M) (Figure 67). Le système est maintenu en mode isocratique à 100% de l'éluant A pendant les vingt premières minutes. Ensuite, un gradient de l'éluant B de 0 à 100% est appliqué pendant 10 min et il est maintenu isocratique à 100% pendant 5 min. Enfin, le système revient en condition isocratique initiale c'est-à-dire 100% de A pendant 45 min supplémentaires.

L'identification et la quantification des monosaccharides des échantillons sont réalisées à l'aide du logiciel Chroméléon version 6.8.

## 2. Profil des poids moléculaires des polysaccharides par Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance (HPSEC)

Les analyses de Poids Moléculaires (PM) des fractions riches en poly- et oligosaccharides sont réalisées par HPSEC (« High Pressure Size Exclusion Chromatography »). Ce système se compose de différents modules : l'UHPLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific), une chambre thermostatée contenant une colonne de garde PW<sub>XL</sub> reliée à une colonne chromatographique d'exclusion stérique, et un système de détection par réfractométrie (Iota 2, Précision Instruments). La colonne utilisée est choisie en fonction de la gamme de masse des polysaccharides ou oligosaccharides à analyser. Les colonnes utilisées sont les suivantes : TSK gel G6000PW<sub>XL</sub> (30 cm x 7,8 mm, 13  $\mu$ m, seuil de coupure : 500 – 50000 kDa), G4000PW<sub>XL</sub> (30 cm x 7,8 mm, 10  $\mu$ m, seuil de coupure : 1 – 700 kDa) et G3000PW<sub>XL</sub> (30 cm x 7,8 mm, 6  $\mu$ m, seuil de coupure : < 60 kDa).

Les échantillons et standards sont préparés à la concentration de 1 mg/ml dans du nitrate de sodium (NaNO<sub>3</sub>, Fisher Chemical) 0,1M, et filtrés sur des filtres PVDF hydrophiles de porosité 0,45  $\mu$ m (Millex-HV, Merck). Les courbes de calibration des différentes colonnes sont déterminées par l'utilisation de standards de dextrans de poids moléculaires compris entre 1 kDa et 670 kDa (Sigma-Aldrich).

100  $\mu$ l d'échantillons ou 20  $\mu$ l de standards sont injectés pour analyse. La température d'analyse est maintenue à 30°C. L'élution est réalisée en mode isocratique avec une solution de NaNO<sub>3</sub> 0,1 M, préalablement filtrée à 0,45  $\mu$ m aPES (ThermoScientific Nalgene Filtration Products), à un débit de 0,7 ml/min. Les poly- et oligosaccharides sont détectés par réfractométrie différentielle et analysés à l'aide du logiciel Chroméléon version 6.8.

Les Masses moléculaires moyennes en nombre ( $M_n$ ), en masse ( $M_w$ ), le Degré de Polymérisation (DP) et l'Indice de polydispersité ( $I_p$ ) sont calculés selon les équations suivantes (Mulloy & Hogwood, 2015) :

$$M_n = \frac{\sum N_i \times M_i}{\sum N_i}, \quad M_0 = \frac{\sum (\% \text{ monosaccharide fraction} \times \text{PM monosaccharide})}{\% \text{ sucres totaux}},$$
$$M_w = \frac{\sum N_i \times M_i^2}{\sum N_i \times M_i}, \quad I_p = \frac{M_w}{M_n},$$
$$DP = \frac{M_n}{M_0},$$

où  $N_i$  représente le nombre d'espèces de polymères,  $M_i$  la masse moléculaire de l'espèce de polymère et  $M_0$  la masse moléculaire d'un monomère du polymère.

Le  $M_0$  est déterminé grâce au pourcentage de chaque monosaccharide identifié dans la fraction analysée (% monosaccharide fraction), au poids moléculaire du monosaccharide identifié correspondant (PM monosaccharide), et au pourcentage de sucres totaux dosés dans la fraction par la méthode de Dubois *et al.* (% sucres totaux).

Le  $M_i$  est déterminé grâce aux courbes de calibration et  $N_i$  correspond à l'aire intégrée sous ces pics.

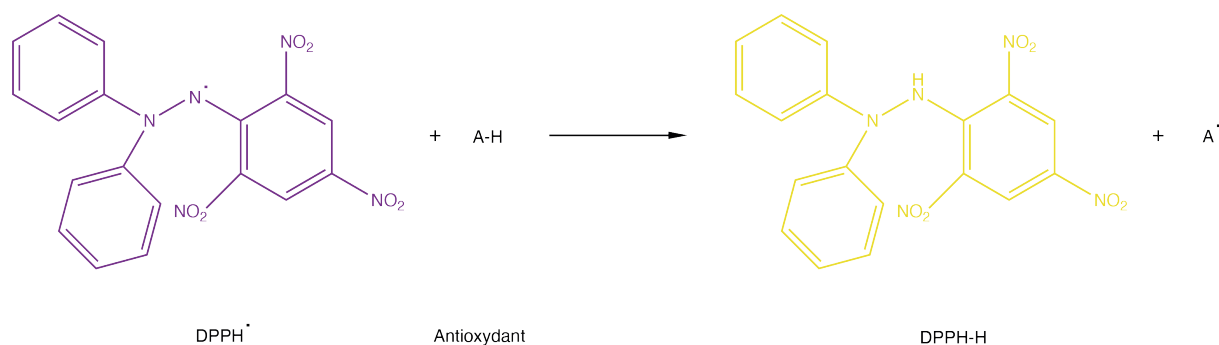
### 3. Spectrométrie de masse couplant source d'ionisation laser assistée par matrice et analyseur à temps de vol (MALDI-TOF)

Des standards de dextrans de 1 et 5 kDa (Sigma-Aldrich) sont utilisés comme étalon de l'analyse MALDI-TOF. 2  $\mu$ l d'échantillons ou standard (1 mg/ml dans eau de grade HPLC, VWR Chemicals) sont mélangés avec 2  $\mu$ l de solution matrice (2,5-dihydroxybenzoic acid 10 mg/ml dans TFA :  $\text{CH}_3\text{CN}$  : 1,75 : 0,75 ; (v/v)). 1  $\mu$ l de cette solution est appliqué sur une plaque en acier inoxydable et laissé sécher sous hotte (Ray, 2006). Les spectres de masse des oligomères sont émis par un spectromètre de masse MALDI-TOF (« Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight ») Microflex (Bruker). Les spectres sont acquis en mode réflectron.

## III. Évaluation d'activités biologiques *in vitro* par des tests biochimiques

### A. Activité antiradicalaire : test DPPH

L'activité antiradicalaire des différentes fractions issues d'*Ulva* sp. est estimée par la méthode *in vitro* du DPPH. Le réactif 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) est un radical stable libre, 100% oxydé en solution dans le méthanol. Dans des conditions oxydantes, le composé DPPH $\cdot$  est violet et absorbe à 517 nm. Sous forme réduite, le composé DPPH-H prend une couleur jaune et n'absorbe plus à 517 nm (Figure 68). En présence d'un antioxydant, le radical DPPH $\cdot$  est réduit par transfert d'hydrogène et aboutit au composé DPPH-H qui n'absorbe plus à 517 nm.



**Figure 68 : Réaction de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> en présence d'antioxydant**

Les échantillons sont solubilisés dans de l'eau ultrapure à différentes concentrations (de 50 à 1000 µg/ml). Un blanc contenant uniquement de l'eau ultrapure est réalisé. Une solution d'acide ascorbique (Fisher Scientific) préparée dans l'eau ultrapure (concentrations finales de 4 à 9 µg/ml) est utilisée comme référence de composé antioxydant.

Dans une microplaque 96 puits, 100 µl d'échantillon aux différentes concentrations, d'acide ascorbique et d'eau ultrapure sont déposés en triplicat. Ensuite, 100 µl de solution de DPPH<sup>•</sup> (0,1 g/L dans du méthanol, Fisher Scientific) sont ajoutés dans chaque puits. La microplaque est ensuite incubée 30 min à 40°C. L'absorbance est finalement mesurée à 517 nm et les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage moyen de piégeage du radical DPPH. La capacité de piégeage du radical DPPH est calculé selon cette équation :

$$\% \text{ piégeage} = \left( \frac{DO_{\text{blanc}} - DO_{\text{échantillon}}}{DO_{\text{blanc}}} \right) \times 100,$$

où  $DO_{\text{blanc}}$  est la Densité Optique (absorbance) de la solution de DPPH en présence d'eau ultrapure et  $DO_{\text{échantillon}}$  est la Densité Optique de l'échantillon testé.

## B. Activité anti-vieillessement : test d'inhibition de l'élastase

L'activité anti-vieillessement des différentes fractions issues d'*Ulva* sp. est évaluée par une méthode *in vitro* basée sur la réaction d'inhibition de l'enzyme élastase porcine (Gertler & Feinstein, 1971).

L'évaluation de l'inhibition de l'activité enzymatique est basée sur l'étude de la cinétique de formation de la *p*-nitroaniline à pH 8 et 25°C à la longueur d'onde de 410 nm, suite à l'hydrolyse du substrat N-methoxysuccinyl-(ala)<sub>2</sub>-pro-val-*p*-nitroanilide par l'élastase (Figure 69).

L'ovomucoïde type II-O issu du blanc d'œuf (Sigma-Aldrich), inhibiteur connu de l'élastase, est préalablement dissous à 1 g/L dans du tampon phosphate 0,67 M pH 7,6. Dans une microplaque 96 puits, 0 à 100 µl d'ovomucoïde sont distribués en duplicat et le volume est ajusté à 100 µl avec un tampon Tris-base 0,1 M pH 8 (Fisher Scientific) et NaCl 0,5 M (Carlo Ebra). En parallèle, 50 µl d'échantillon à 2 mg/ml sont ajoutés dans chaque puits suivis de 50 µl de tampon Tris-base. Un contrôle négatif est effectué en utilisant 50 µl d'eau ultrapure additionnés de 50 µl de tampon Tris-base. Ensuite, 50 µl de solution d'élastase à 0,4 U/ml (Sigma-Aldrich) dans du tampon Tris-base sont ajoutés dans chaque puits (inhibiteur de référence, échantillon et contrôle négatif) et homogénéisés.

La réaction débute après ajout de 50 µl par puits de substrat N-methoxysuccinyl-(ala)<sub>2</sub>-pro-val-*p*-nitroanilide (Sigma-Aldrich) 0,68 mM préparé dans du tampon Tris-base. La microplaque est incubée pendant 40 min à 25°C et l'absorbance est mesurée à 410 nm toutes les 5 min. Le pourcentage d'inhibition pour chaque échantillon est calculé avec l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \left( \frac{P_{\text{contrôle négatif}} - P_{\text{échantillon}}}{P_{\text{contrôle négatif}}} \right) \times 100,$$

où  $P_{\text{contrôle négatif}}$  est la pente obtenue pour l'enzyme en présence d'eau ultrapure et  $P_{\text{échantillon}}$  est la pente obtenue pour l'enzyme en présence d'échantillons. Des mesures en triplicat sont réalisées.

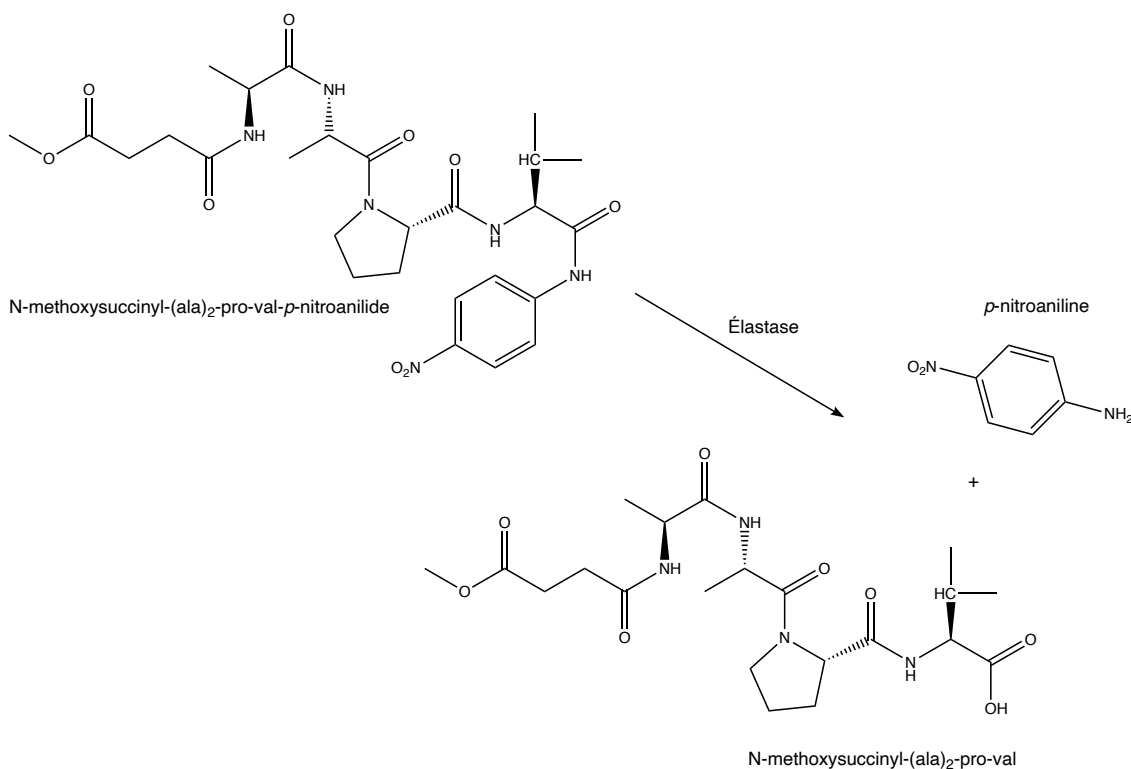
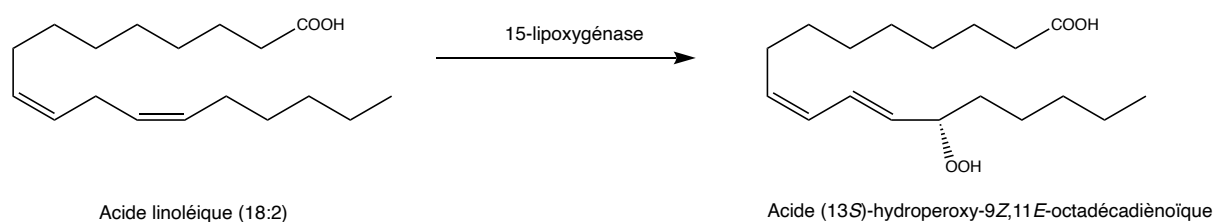


Figure 69 : Hydrolyse de la N-methoxysuccinyl-ala-ala-pro-val-*p*-nitroanilide par l'élastase

### C. Activité anti-inflammatoire : test d'inhibition de la lipoxygénase

L'activité anti-inflammatoire des différentes fractions issues d'*Ulva* sp. est estimée par le test *in vitro* d'inhibition de la lipoxygénase. Les LipOXygénases (LOX) sont des protéines monomériques qui catalysent la dioxygénation régio- et stéréospécifique des Acides Gras PolyInsaturés (AGPI) ainsi que leurs esters afin de générer des hydroperoxydes. Les AGPI contiennent un système (1*Z*, 4*Z*)-pentadiène, et correspondent à des acides tels que l'acide linoléique, linoléique ou arachidonique (Feussner & Wasternack, 2002 ; Sanda Chedea & Jisaka, 2011 ; Mashima & Okuyama, 2015). En raison de son action sur les AGPI, la LOX joue un rôle clé dans l'inflammation (Sanda Chedea & Jisaka, 2011 ; Lu *et al.*, 2013). En effet, les LOX participent activement à la biosynthèse de leucotriènes, principaux médiateurs du processus inflammatoire (Haeggström & Funk, 2011).

La 15-lipoxygénase extraite du soja (Glycine max type I-B, Merck) utilise l'acide linoléique comme substrat et le transforme en hydroperoxyde (Figure 70). Les hydroperoxydes produits absorbent à la longueur d'onde de 234 nm ce qui permet un suivi de l'activité enzymatique par spectrophotométrie.



**Figure 70 : Réaction d'oxydation de l'acide linoléique par la 15-lipoxygénase**

Les fractions issues d'*Ulva* sp. sont solubilisées dans de l'eau ultrapure à une concentration de 2 mg/ml et filtrés sur une membrane d'acétate de cellulose de 0,20 µm. La réaction est réalisée dans une microplaque en quartz (Thermo Fisher Scientific) n'absorbant pas dans les UV. La microplaque est conservée sur la glace pour limiter la dégradation de l'enzyme pendant la préparation. L'activité des fractions est évaluée contre un inhibiteur de référence (contrôle positif) : l'EpiGalloCatéchine Gallate (EGCG, Acros Organics) à 250 µg/ml. Un contrôle négatif correspondant au 100% d'activité de l'enzyme est préparé en utilisant de l'eau ultrapure. Une solution d'enzyme à 560 U/ml est préparée dans du tampon borate 0,2 M pH 9 (Thermo Fisher Scientific) et 90 µl de cette solution sont déposés dans chaque puits. 50 µl d'échantillons, d'EGCG (contrôle positif) ou d'eau ultrapure (contrôle négatif) sont ensuite ajoutés. Le volume est ajusté dans chaque puits à 190 µl par ajout de tampon borate. La microplaque est ensuite incubée 10 min à 25°C. À t = 0 min, 10 µl d'une solution d'acide linoléique à 1 mM (Sigma-Aldrich) réalisée dans de l'eau distillée à 10% (v/v) d'éthanol, sont ajoutés dans chaque puits. Une première lecture d'absorbance à 234 nm est réalisée immédiatement après ajout du substrat (t = 0 min). Afin de réaliser une cinétique, des lectures successives sont ensuite réalisées toutes les 2,5 min pendant 10 min. L'évaluation de l'inhibition est calculée à partir de la pente de la droite (P) correspondant à la dégradation de l'acide linoléique dans le temps selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \left( \frac{P_{\text{contrôle négatif}} - P_{\text{échantillon}}}{P_{\text{contrôle négatif}}} \right) \times 100,$$

où  $P_{\text{contrôle négatif}}$  est la pente obtenue pour l'enzyme en présence d'eau ultrapure et  $P_{\text{échantillon}}$  est la pente obtenue pour l'enzyme en présence d'échantillons. Des mesures en triplicat sont réalisées.

## IV. Évaluation d'activités biologiques *in vitro* sur fibroblastes dermiques humains

### A. La culture cellulaire

#### 1. Obtention des fibroblastes

Les échantillons de fibroblastes dermiques humains sont fournis par le Laboratoire Interaction Épithéliums Neurons (LIEN), EA 4685, Brest, France. Les échantillons de derme humain sont extraits à partir de biopsies cutanées de donneurs sains subissant une abdominoplastie. Préalablement, tous les patients ont signé un formulaire de consentement et l'étude est menée conformément à la déclaration d'Helsinki (Association Médicale Mondiale, 2013).

Les échantillons ont été acceptés par le comité de protection des données locales (Comité de protection Ouest VI) et référencés sous le code DC 2016-2833.

Les échantillons de peau, après décontamination microbienne, sont traités à la Dispase pendant une nuit à 4°C afin d'effectuer la digestion enzymatique de la jonction dermo-épidermique. Le derme et l'épiderme sont ensuite séparés. Les morceaux de derme sont découpés et déposés dans une flasque de 75 cm<sup>2</sup> coatée avec du collagène de type I de queue de rat (Sigma-Aldrich). Du milieu complet, c'est-à-dire comprenant du « Dubelcco's Modified Eagle Medium » (DMEM-F12, Lonza), 10% (v/v) de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Sigma-Aldrich), et de la Normocin™ (InvivoGen), est ajouté dans la flasque avec les morceaux de derme afin de les mettre en suspension. Les morceaux de derme adhèrent au support durant 10 à 12 jours dans un incubateur à température contrôlée de 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, en renouvelant le milieu tous les 3-4 jours. Après cette période, les morceaux de derme sont éliminés et la culture de fibroblastes est maintenue par ajout de milieu complet. Les cellules sont ensuite congelées dans des cryotubes (1 million de cellules/cryotube) dans du SVF pur/DMSO (270/30, (v/v)) et placées au -80°C ou dans de l'azote liquide.

## 2. Amplification des fibroblastes

Pour les expérimentations, les fibroblastes sont initialement mis en culture dans une flasque de 25 cm<sup>2</sup> après décongélation avec du DMEM (DMEM-F12, Gibco) complémenté de 1% de solution antibiotique (Penicilline, Streptomycine 10000U/ml, Gibco), 1% d'antifongique (v/v) (Fungizone, Amphotericine B, Gibco) et 10% de SVF (Gibco). Les cultures cellulaires sont maintenues dans un incubateur à température contrôlée de 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont détachées du support par action d'une solution de trypsine-EDTA (trypsine 0,05%, EthylèneDiamineTétraAcétique 0,25 mM, Gibco) après avoir atteint la confluence. L'action de la trypsine est inhibée par ajout de DMEM additionné de 10% de SVF. Les cellules sont réensemencées dans une flasque de 75 cm<sup>2</sup>. Les fibroblastes sont ensuite amplifiés par passages successifs afin d'obtenir des quantités suffisantes de cellules pour les différentes expérimentations. Toutes les expériences sont réalisées entre le 3<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> passage. Les expérimentations sont réalisées à la fois sur des fibroblastes issus de patientes jeunes et âgées.

Pour les analyses, les cellules sont ensemencées sur des microplaques 96, 12 ou 6 puits à une densité de 4000, 50000 et 200000 cellules/puits respectivement. Après avoir atteint 80% de confluence, les cellules sont incubées avec du DMEM à 2% de SVF en l'absence ou en présence d'échantillons pendant 24 h ou 48 h. Les échantillons sont préparés dans le milieu de culture DMEM à 2% de SVF et filtrés sur 0,22 µm.

## B. Évaluation de la prolifération et de la cytotoxicité cellulaire

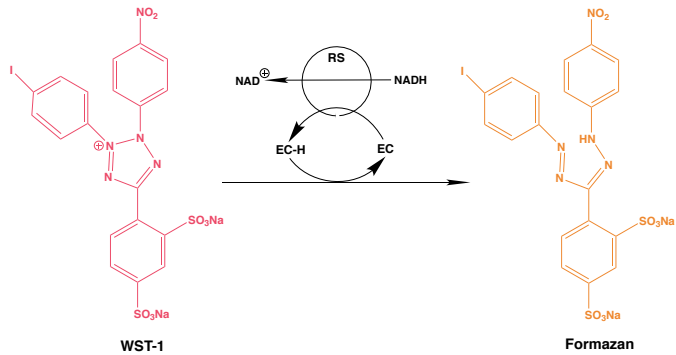
---

### 1. Mesure de la prolifération cellulaire par le test WST-1

L'effet des différentes fractions issues d'*Ulva* sp. sur la prolifération des fibroblastes dermiques humains est estimé par le test *in vitro* du WST-1.



Ce test est basé sur la conversion des sels de tétrazolium WST-1 (2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H-tétrazolium) en formazan (colorant orange) par les déshydrogénases mitochondriales cellulaires (Figure 71). Le changement de couleur est directement proportionnel à la quantité de cellules en culture métaboliquement actives. Ce test permet ainsi de quantifier par spectrophotométrie la prolifération et la viabilité cellulaire.



**Figure 71 : Clivage du sel de tétrazolium WST-1 en formazan par les déshydrogénases mitochondriales** (EC = réactif de couplage électronique, RS = système mitochondriale succinate-tétrazolium réductase)

Les cellules sontensemencées dans une microplaque 96 puits avec du milieu DMEM à 10% de SVF. Après avoir atteint 80% de confluence, le milieu de culture est changé et remplacé soit par du DMEM 2% SVF seul (contrôle), soit par du DMEM 2% SVF en présence d'échantillons à évaluer aux concentrations de 50, 100, 250, 500 et 1000 µg/mL. Les cellules sont mises à incuber pendant 24 et 48 h et le milieu reste inchangé pendant ces temps d'incubation. Après incubation, le milieu de culture est éliminé, et 100 µl de réactif WST-1 (kit de prolifération cellulaire WST-1, Roche Diagnostics, Meylan, France) dilué au 40<sup>e</sup> dans du DMEM à 2% de SVF sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est alors incubée pendant 45 min à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. L'absorbance est mesurée à 450 et 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Varioskan Lux, Thermo Scientific). Le pourcentage de prolifération cellulaire est calculé selon l'équation suivante :

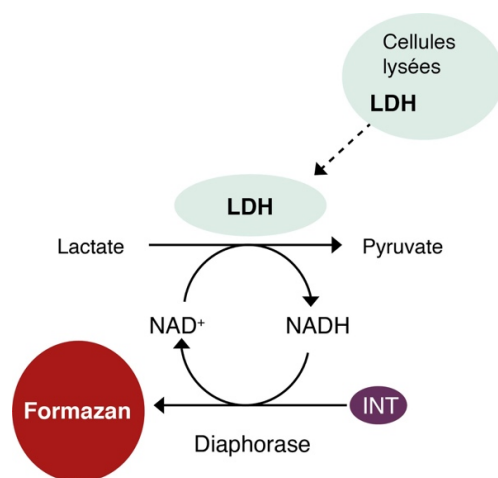
$$\text{Pourcentage de variation (\%)} = \frac{DO_{450} (\text{Échantillon}) - DO_{630} (\text{Échantillon})}{DO_{450} (\text{Contrôle}) - DO_{630} (\text{Contrôle})} \times 100.$$

où DO<sub>450</sub> est la densité optique (absorbance) à 450 nm et DO<sub>630</sub> est la densité optique à 630 nm.

## 2. Mesure de la cytotoxicité par le test de la lactate déshydrogénase (LDH)

La cytotoxicité éventuelle des différentes fractions issues d'*Ulva* sp. sur les fibroblastes dermiques humains est estimée par le test *in vitro* de la LDH.

Le principe de ce test repose sur la mesure de la LDH, enzyme cytosolique stable libérée dans le milieu extracellulaire lors de la lyse cellulaire. La LDH libérée dans les surnageants de culture est mesurée par un dosage enzymatique suite à la conversion d'un sel de tétrazolium (iodonitrotétrazolium) de couleur violette en formazan de couleur rouge (Figure 72). La production de formazan est proportionnelle à la quantité de LDH libérée et donc aux nombres de cellules lysées.



**Figure 72 : Libération de LDH par les cellules lysées mesurée par supplémentation de lactate, NAD<sup>+</sup> et de l'INT comme substrats en présence de diaphorase** Modifié d'après Promega (2016).

Les cellules sont ensemencées dans une microplaque 96 puits avec 100 µl de milieu DMEM à 10% de SVF. Après avoir atteint 80% de confluence, le milieu de culture est changé et remplacé soit par du DMEM 2% SVF seul (contrôle ou contrôle négatif), soit par du DMEM 2% SVF en présence d'échantillons à évaluer aux concentrations de 50, 100, 250, 500 et 1000 µg/mL. Les cellules sont mises à incuber pendant 24 et 48 h et le milieu reste inchangé pendant ces temps d'incubation. Le dosage de la LDH (CytoTox96<sup>®</sup>, Promega) est réalisé conformément aux instructions du fabricant. Pour cela, le contrôle positif c'est-à-dire le contrôle de libération maximum de la LDH (contrôle positif : cytotoxicité = 100%), est réalisé en ajoutant 10 µl de solution de lyse 10X (Triton X-100 à 9%, v/v) pendant 45 minutes avant l'ajout du réactif CytoTox96<sup>®</sup>. Après les 45 min d'incubation, 50 µl de surnageant de culture cellulaire des différentes conditions testées sont transférés dans les puits d'une nouvelle microplaque 96 puits. Ensuite, 50 µl de réactif CytoTox96<sup>®</sup> sont ajoutés par puits. La plaque est ensuite incubée 30 min à TA à l'obscurité. La réaction est arrêtée par addition de 50 µl par puits de solution « Stop » (acide acétique 1 M). La libération de la LDH est quantifiée en mesurant l'absorbance à 490 nm (DO<sub>490</sub>) à l'aide d'un lecteur de microplaques (Varioskan Lux, Thermo Scientific). Le pourcentage de cytotoxicité est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{\text{DO}_{490} \text{ (Libération LDH expérimental)}}{\text{DO}_{490} \text{ (Contrôle de libération maximum LDH)}} \times 100.$$

### C. Mise en évidence du collagène total : coloration au rouge Sirius

---

La coloration au rouge Sirius permet de mettre en évidence le collagène total produit par les fibroblastes dermiques humains. La solution de rouge Sirius (colorant anionique) interagit avec les chaînes répétitives latérales des molécules de collagène.

Les fibroblastes sont ensemencés à une densité de 50000 cellules/puits dans une plaque 12 puits avec du DMEM 10% SVF. Lorsque les cellules sont à 80% de confluence, le milieu de culture est éliminé.

Les cellules sont incubées pendant 48 h avec 500 µl de fractions issues d'*Uva* sp. à 50 et 1000 µg/ml ou 500 µl de DMEM 2% SVF (contrôle). Après incubation, le milieu est éliminé et les cellules sont rincées deux fois avec du PBS 1X (« Phosphate-Buffered Saline »). Ensuite, 1 ml de solution de Bouin (solution aqueuse contenant 5% (v/v) d'acide acétique, 9% (v/v) de formaldéhyde et 0,9% (v/v) d'acide picrique), est ajouté dans chaque puits, et la plaque est agitée 1 h à TA permettant ainsi la fixation des cellules. Après élimination de la solution de Bouin, les cellules sont lavées deux fois avec de l'eau distillée et laissées sécher à l'air libre. Les cellules sont ensuite colorées pendant 1 h sous agitation à TA avec 1 ml de solution de rouge Sirius par puits (100 mg de Sirius Red 80 dans 100 ml d'une solution aqueuse saturée d'acide picrique). Après coloration, la solution est éliminée et les cellules sont rincées successivement avec de l'eau distillée et de l'HCl 0,01 M pour éliminer le colorant non lié. Le colorant lié est finalement solubilisé dans 200 µl de NaOH 0,1 M par puits pendant 30 min sous agitation à TA. Enfin, la solution colorée est transférée dans une nouvelle microplaque 96 puits (100 µl/puits) pour une lecture de l'absorbance à 550 nm (DO<sub>550</sub>). Le pourcentage de synthèse de collagène total est calculé selon l'équation suivante : Pourcentage de variation (%) =  $\frac{\text{DO}_{550} \text{ (Échantillon)}}{\text{DO}_{550} \text{ (Contrôle)}} \times 100.$

## D. Mise en évidence des glycosaminoglycanes : coloration au bleu alcian

---

La coloration au bleu alcian met en évidence deux types de GlycosAminoGlycanes (GAG) en fonction du pH de la solution utilisée. Une solution pH 1 met en évidence les GAG sulfatés : le kératane sulfate, le chondroïtine sulfate, l'héparane sulfate et le dermatane sulfate. Tandis qu'une solution pH 2,5 met en évidence les GAG non sulfatés : l'acide hyaluronique.

Les fibroblastes sont ensemencés à une densité de 50000 cellules/puits dans une plaque 12 puits. Lorsque les cellules sont à 80% de confluence, le milieu de culture est éliminé. Les cellules sont incubées pendant 48 h avec 500 µl de fractions issues d'*Ulva* sp. à 50 et 1000 µg/ml ou 500 µl de DMEM 2% SVF seul (contrôle). Après incubation, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées une fois avec du PBS 1X (500 µl/puits). Le pH des cellules est ensuite abaissé par ajout d'une solution HCl 0,1 M à pH 1 ou d'une solution d'acide acétique 3% (v/v) dans de l'eau distillée à pH 2,5 (500 µl/puits) pendant 5 min sous agitation à TA. Le tapis cellulaire est ensuite coloré pendant 30 min sous agitation à TA par une solution de bleu alcian (8GX, Sigma-Aldrich) à pH 1 (1% (w/v) dans la solution d'HCl 0,1 M) ou pH 2,5 (1% (w/v) dans la solution d'acide acétique glacial à 3% (v/v)). Les cellules sont ensuite rincées deux fois à l'eau courante (500 µl/puits) pendant 5 min sous agitation à TA, puis séchées sous hotte avant d'être à nouveau rincées à l'eau distillée (500 µl/puits). Enfin, le colorant lié est solubilisé par ajout de 200 µl par puits de chlorure de guanidium 6M (G3272, Sigma-Aldrich) pendant 5 à 10 min sous agitation à TA. La solution colorée est transférée dans une nouvelle microplaque 96 puits (100 µl/puits) pour lecture de l'absorbance à 600 nm ( $DO_{600}$ ). Le pourcentage de synthèse de GAG est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage de variation (\%)} = \frac{DO_{600} (\text{Échantillon})}{DO_{600} (\text{Contrôle})} \times 100.$$

## E. Mesures protéiques : Enzyme-linked immunosorbent assay et Western Blot

---

Les fibroblastes sont ensemencés à une densité de 200000 cellules/puits dans une plaque 6 puits. Lorsque les cellules sont à 80% de confluence, le milieu de culture est éliminé. Les cellules sont incubées pendant 48 h avec 1500 µl de fractions issues d'*Ulva* sp. à 50 et 1000 µg/ml ou 1500 µl de DMEM à 2% de SVF seul (contrôle).

### 1. Extraction des protéines cellulaires

Après les 48 h d'incubation, les cellules sont placées sur glace et rincées deux fois avec du PBS 1X. 300 µl d'un mélange de tampon RIPA (R0278, Sigma-Aldrich) et de cocktail d'inhibiteurs de protéases (P8340, Sigma-Aldrich) sont ensuite ajoutés dans chaque puits. Les cellules sont mises sous agitation pendant 1 h à 4°C et sont ensuite grattées.

Le contenu de chaque puits est récupéré et vortexé toutes les 5 min pendant 30 min afin de libérer les protéines cellulaires. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 4°C pendant 30 min à 14000 g. Le surnageant contenant les protéines intracellulaires est récolté et conservé à -80°C. La concentration protéique est déterminée par la méthode « Pierce BCA Protein Assay » (décrite en section II.A.6 de ce chapitre, p. 143) avec une calibration de 0 à 2000 µg/ml de BSA.

### **2. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)**

Les milieux de culture cellulaire contenus dans chaque puits, après 48 h d'incubation, sont récupérés, centrifugés à 2000 g pendant 10 min à 4°C, aliquotés et conservés à -80°C avant analyse.

Le procollagène type I alpha 1 et la MMP-1 synthétisés par les cellules et libérés dans le milieu de culture sont respectivement mesurés grâce aux kits « Human Pro-Collagen I alpha 1 SimpleStep ELISA Kit » (ab210966, Abcam) et « Human MMP1 SimpleStep ELISA Kit » (ab215083, Abcam).

Le test ELISA est basé sur une technique immunologique faisant intervenir un anticorps d'immobilisation et un cocktail d'anticorps de capture et de détecteur conjugué pour la quantification d'une protéine cible. Les puits de la plaque sont recouverts d'anticorps d'immobilisation anti-protéine.

Les échantillons de culture cellulaire à évaluer sont préalablement dilués au 1/2000<sup>e</sup> ou 1/2500<sup>e</sup> dans du tampon d'essai fourni dans le kit. 50 µl d'échantillons ou de standard sont ajoutés dans les puits de la plaque. Ensuite, 50 µl/puits de cocktail d'anticorps sont ajoutés et la plaque est incubée 1 h à TA sous agitation (420 rpm). Après incubation, les puits sont rincés trois fois avec 350 µl de tampon de lavage 1X du kit. Après lavage, 100 µl de solution de développement TMB (TétraMéthylBenzidine) du kit sont ajoutés dans chaque puits et la plaque est à nouveau scellée et mise à incuber 10 min à TA à l'obscurité sous agitation (420 rpm). 100 µl de solution Stop (5% d'acide méthylsulfonique) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite agitée pendant 1 min à 420 rpm et l'absorbance est finalement mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Varioskan Lux, Thermo Scientific).

Les quantités de procollagène type I alpha 1 et de MMP-1 sont déterminées à partir d'une gamme étalon réalisée à partir de « Human Pro-collagen I alpha 1 Lyophilized Recombinant Protein » (0 à 2000 pg/ml) et « Human MMP1 Lyophilized Recombinant Protein » (0 à 6000 pg/ml) respectivement. Les résultats sont normalisés à partir de la quantité de protéines du tapis cellulaire correspondant.

### **3. Western Blot**

Le Western Blot (WB) est une technique permettant l'immunodétection et la quantification de protéines cibles dans un échantillon complexe. Elle repose sur une interaction anticorps/antigène suite à une séparation des protéines de l'échantillon par électrophorèse SDS-PAGE.

#### **a) Préparation des échantillons protéiques et standard**

Le surnageant contenant les protéines intracellulaires est utilisé pour l'identification et la quantification de protéines d'intérêt de la MEC : collagènes de type I et III, MMP-1 et TIMP-1.

Les échantillons protéiques sont traités en conditions réductrices et dénaturantes afin de casser les structures protéiques tridimensionnelles *via* la destruction des ponts disulfures.

Pour cela, 10 µg d'échantillons protéiques sont incubés 5 min à 95°C dans du tampon de migration dénaturant Laemmli 4X/DTT 1 M (ratio 9 : 1) puis centrifugés 1 min à 16000 g à 4°C.

Un gel d'électrophorèse de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE), « Mini-PROTEAN TGX (« Tris-Glycine eXtended ») Stain-Free gel » (Bio-Rad) de 7,5% (collagène de type I et III) ou 4 – 15% (MMP-1 et TIMP-1) est introduit dans la chambre d'électrophorèse avec du TGS 1X (Tris-Glycine-SDS). Les échantillons et le « Precision Plus Protein™ Unstained Protein standard » (Bio-Rad) sont ensuite chargés sur le gel.

La technologie Stain-Free est basée sur un gel incorporant un composé trihalogéné, qui lorsqu'il est exposé à une irradiation UV, active une réaction qui forme une liaison covalente entre ce composé trihalogéné et les résidus tryptophane des protéines du gel entraînant une fluorescence. Les fluorophores restent liés de manière covalente aux protéines lors du transfert sur membrane. Ainsi, ils peuvent être visualisés sur des gels ou sur des membranes PVDF.

La technologie permet également la normalisation des bandes par rapport aux protéines totales d'un transfert, éliminant ainsi l'utilisation de protéines domestiques de référence pour la quantification protéique (Yang *et al.*, 2010 ; Gürtler *et al.*, 2013 ; Gilda & Gomes, 2013 ; Taylor & Posch, 2014 ; Rivero-Gutiérrez *et al.*, 2014).

### **b) Électrophorèse SDS-PAGE**

Les protéines d'un échantillon sont séparées par électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire. La migration s'effectue à voltage constant de 200 V pendant 30 min.

Lorsque la migration est terminée, le gel « Mini-PROTEAN TGX Stain Free » est activé dans le système ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) *via* le logiciel Image Lab version 6.01.1.

### **c) Electro-transfert sur membrane**

Les protéines du gel sont ensuite transférées sur une membrane Trans-Blot Turbo Mini 0,2 µm PVDF (Bio-Rad) *via* l'utilisation du « Trans-Blot Turbo Transfer System » (Bio-Rad) pendant 7 min à 1,3 A et 25 V. La membrane est ensuite analysée dans le système ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) *via* le logiciel Image Lab version 6.01.1 (Bio-Rad). L'analyse de la membrane sert par la suite à la normalisation totale des protéines. En effet, la méthode de normalisation est basée sur les signaux de référence obtenus par l'intensité des protéines totales de chaque échantillon analysé présent sur la membrane de transfert.

### **d) Immunoblotting**

La membrane est ensuite saturée (aussi appelé blocage de la membrane), avec une solution filtrée de BSA (3%) ou de lait en poudre (5%) sans Matière Grasse (MG) dans du TBST 1X (Tris-Buffered Saline + 0,1% Tween 20) pendant 1 h à TA, à l'obscurité, sous agitation légère. Le blocage a pour but de limiter les fixations non spécifiques des AntiCorps (AC) primaire (I) et secondaire (II) lors des étapes suivantes. La membrane est ensuite rincée dans du TBST (1 à 2 fois pendant 5 min).

Les membranes sont ensuite mises en présence de l'AC I dirigé contre le site épitopique de la protéine d'intérêt : collagènes de type I ou III (Novotec), MMP-1 (EnoGene) et TIMP-1 (RayBiotech). Les paramètres de l'immunoblotting (solution de blocage, facteur de dilution, temps et température d'incubation des AC I) sont présentés dans le Tableau IX.

Après incubation avec l'AC I, la membrane est rincée 5 fois 5 min avec du TBST. La membrane est ensuite incubée pendant 1 h à TA, sous agitation, à l'obscurité, avec l'AC II (« HorseRadish Peroxydase », HRP) (Jackson ImmunoResearch) complété de « StrepTactin-HRP Conjugate » (1/10000<sup>e</sup>) pour la détection du standard protéique « Precision Plus Protein » (Tableau IX). La membrane est à nouveau rincée 5 fois 5 min avec du TBST.

**Tableau IX : Paramètres de l'immunoblotting**

		Collagène de type I	Collagène de type III	MMP-1	TIMP-1
<b>Blocage</b>		3% BSA	5% lait sans MG	3% BSA	5% lait sans MG
<b>AC I</b>	Dilution	1/2000 <sup>e</sup> dans TBST	1/500 <sup>e</sup> dans 5% lait sans MG	1/1000 <sup>e</sup> dans TBST 1X	1/1000 <sup>e</sup> dans TBST 1X
	Temps	O/N	O/N	2 h	O/N
	Température	4°C	4°C	TA	4°C
<b>AC II</b>	Dilution	1/5000 <sup>e</sup> dans TBST			
	Temps	1 h			
	Température	TA			

O/N : OverNight ; TA : Température Ambiante ; MG : Matière Grasse ; TBST 1X : Tris-Buffered Saline + 0,1% Tween 20

Le « Clarity Western ECL substrate » (Bio-Rad) est ensuite mis en contact avec la membrane pendant 5 min à TA, sous agitation, à l'obscurité. Ce substrat chimio-luminescent réagit avec l'AC II couplé à la HRP. La révélation est ensuite réalisée en utilisant le système ChemiDoc XRS+.

La quantification des protéines d'intérêt se fait *via* le logiciel Image Lab version 6.01.1 (Bio-Rad), en utilisant la technique de normalisation des protéines.

## F. Mesure de l'activité enzymatique de la MMP-1 par zymographie

Le surnageant contenant les protéines intracellulaires est utilisé pour la quantification de l'activité de la MMP-1. Les échantillons protéiques (5 µg) sont additionnés de tampon de migration (62,5 mM Tris HCl pH 6,8, glycérol 20% (v/v), SDS 4% (w/v), bleu de bromophénol 0,01% (w/v)) puis centrifugés 1 min à 16000 g à 4°C.

Un gel SDS-PAGE à 10% de polyacrylamide copolymérisé avec une solution de « Rat tail type I collagen » (Gibco) à la concentration finale de 1 mg/ml est introduit dans la chambre d'électrophorèse avec du TGS 1X. Les échantillons et standard « All Blue™ » (Bio-Rad) sont chargés sur le gel.

La migration s'effectue à voltage constant de 110 V pendant 2 h à 4°C. Le gel est ensuite lavé 2 fois 15 min à TA sous agitation dans du Triton X-100 2,5% (v/v) pour éliminer le SDS, puis incubé dans du « Zymogram Development Buffer » (Bio-Rad) pendant 48 h à 37°C.

Après incubation, le gel est coloré par une solution aqueuse contenant du méthanol 40% (v/v), de l'acide acétique 10% (v/v) et du bleu de coomassie R-250 à 0,5% (w/v) pendant 1 h à TA sous agitation. Le gel est finalement décoloré par une solution aqueuse contenant du méthanol 40% (v/v) et de l'acide acétique 10% (v/v) jusqu'à l'apparition de bandes claires.

L'activité collagénase de la MMP-1 correspond donc aux bandes claires contre un gel coloré au bleu de coomassie. La quantification est réalisée *via* le logiciel Image Lab version 6.01.1 (Bio-Rad).

## G. Quantification des ARNm

---

### 1. Extraction des ARN totaux

Les fibroblastes sont ensemencés à une densité de 50000 cellules/puits dans des plaques 12 puits avec du milieu de culture DMEM additionné de 10% (v/v) de SVF. Lorsque les cellules sont à 80% de confluence, le milieu de culture est éliminé. Les cellules sont incubées pendant 48 h avec 500 µl de fractions issues d'*Ulva* sp. à 50 et 1000 µg/ml ou 500 µl de DMEM à 2% de SVF seul (contrôle).

Après incubation, le milieu est éliminé et les cellules sont rincées deux fois avec du PBS 1X. Les ARN totaux sont extraits à l'aide de « TRIzol® » (Invitrogen). Pour cela, 200 µl de Trizol sont déposés dans chaque puits afin de lyser le tapis cellulaire puis transférés dans des eppendorfs. Ensuite, 40 µl de chloroforme (Acros Organics) sont ajoutés et le mélange est incubé 5 min à TA. Après 15 min de centrifugation à 12000 g à 4°C, la phase aqueuse contenant les ARN présents est récupérée et les ARN sont précipités par ajout de 100 µl d'isopropanol (Fisher Bioreagents) pendant 1 h à -20°C. Après 10 min de centrifugation à 12000 g à 4°C, le culot d'ARN est lavé avec 200 µl d'éthanol 75% et homogénéisé en vortexant. Après 5 min de centrifugation à 7500 g à 4°C, le culot d'ARN est séché 5 min sous sorbonne puis dissout dans 15 µl d'eau DEPC (DiEthylPyroCarbonate, Fisher Scientific).

La quantité d'ARN est estimée en mesurant l'absorbance (DO) à 260 nm sur une µDrop™ Plate (Thermo Scientific). Le degré de pureté est vérifié par le rapport de  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  qui doit être compris entre 1,8 et 2.

### 2. Synthèse d'ADNc à partir d'ARNm et RT-qPCR

#### a) Traitement à la DNase I

Un traitement à la DNase I (« iScript Dnase master mix », Bio-Rad) est réalisé sur 1 µg d'ARN total. Les échantillons sont incubés 5 min à 25°C (digestion de l'ADN) et 5 min à 75°C (inactivation de la DNase).

#### b) PCR de contrôle après traitement à la DNase I

La pureté des ARN est évaluée en effectuant une PCR (« Polymerase Chain Reaction ») de contrôle sur les échantillons précédemment traités à la DNase I. Pour cela, 0,5 µl d'échantillon, 2,5 µl de « PCR Master Mix 2X » (Thermo Scientific), 0,25 µl d'amorces de β-actine 20X (62 pb, Bio-Rad) et 1,75 µl d'eau DEPC sont mélangés.



Les échantillons sont ensuite soumis à une dénaturation initiale (1 min à 95°C) puis les 35 cycles suivants sont répétés : 30 sec à 95°C (dénaturation), 30 sec à 55°C (hybridation) et 1 min à 72°C (élongation), avant de terminer 10 min à 72°C (extension finale) (SimpliAmp Thermal Cycler, Applied Biosystems). Les produits de la PCR sont ensuite déposés sur un gel d'agarose à 0,8% (w/v) (Sigma-Aldrich) et de *gel red 1X* (« *Gel Red nucleic acid stain* », VWR) en présence de TBE 1X (Tris-Borate-EDTA, Bio-Rad). Le résultat attendu doit être négatif c'est-à-dire qu'aucune bande ne doit apparaître après révélation UV du gel afin d'attester de l'absence d'ADN génomique. Si une bande apparaît, l'échantillon est à nouveau traité à la DNase I et une deuxième PCR de contrôle négatif est réalisée.

### c) Rétro-transcription des ARNm

Pour la rétro-transcription ou réaction de transcription inverse, 16 µl d'échantillon d'ARN traité à la DNase sont mélangés à 4 µl d'« iScript Reverse Transcription Supermix » (Bio-Rad), composé de transcriptase inverse MMLV, dNTPs, oligo(dT), random primers et d'inhibiteurs de ribonucléases. Les étapes de la synthèse d'ADNc par rétro-transcription sont les suivantes : 5 min à 25°C (initiation), 20 min à 46°C (transcription inverse) et 1 min à 95°C (inactivation de la rétro-transcription).

### d) PCR de contrôle après rétro-transcription

Une nouvelle PCR de contrôle est effectuée sur les échantillons ayant subi la rétro-transcription selon le protocole énoncé au paragraphe b) précédent. Si la rétro-transcription a été efficace, le résultat attendu doit être positif (bande à 62 pb de la  $\beta$ -actine) attestant de la présence d'ADNc.

### e) RT-PCR en temps réel, technologie SYBR Green

La PCR en temps réel (RT-qPCR) permet de suivre à chaque cycle la génération des amplicons correspondant au gène analysé grâce au fluorophore « SYBR Green ». La fluorescence du SYBR Green est peu intense à l'état libre et fortement augmentée lorsqu'il s'intercale à l'ADN double brin. Le SYBR Green est excité à 494 nm et émet à 521 nm.

Les réactions d'amplification sont réalisées en triplicat dans un volume total de 20 µl contenant 1 µl d'ADNc de l'échantillon dilué au 1/15<sup>e</sup> (3 ng/µl), 1 µl d'amorces (voir Tableau X, Bio-Rad), 10 µl d'« iTaq/SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix 2X » (Bio-Rad) et 8 µl d'eau DEPC. Des témoins « non template » sont inclus dans les expériences de PCR afin de s'assurer de la non-contamination des réactifs (amorces, SYBR® Green Supermix et eau DEPC). Le programme de PCR comporte une phase de pré-incubation de 2 min à 95°C. Ensuite, les conditions d'amplification sont de 40 cycles comportant les étapes suivantes :

- La dénaturation : 5 sec à 95°C.
- L'hybridation et l'élongation : 30 sec à 60°C.
- La dissociation : 5 sec à 95°C.

La mesure de la fluorescence se fait automatiquement à la fin de chaque élongation du cycle. L'analyse de la courbe de fusion est faite par une étape de 5 sec à 65°C suivie d'une augmentation finale de température 0,5°C de 65°C à 95°C afin de réaliser une courbe de dissociation. L'analyse de cette courbe permet de déterminer la spécificité des amplicons.



L'expression relative du gène d'intérêt est calculée en utilisant la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  et normalisée par rapport à celle du gène de référence *RPL13A* (« Ribosomal Protein L13A »).

**Tableau X : Amorces utilisées en RT-PCR en temps réel (Bio-Rad)**

Gène d'intérêt	Identifiant unique de l'amorce	Longueur de l'amplicon (pb)	Localisation chromosomique
<i>RPL13A</i>	qHsaCED0020417	118	19:49995272-49995419
<i>COL1A1</i>	qHsaCED0043248	113	17:48277174-48278779
<i>COL1A2</i>	qHsaCED0003988	139	7:94060134-94060302
<i>COL3A1</i>	qHsaCED0046560	107	2:189873813-189874905
<i>MMP-1</i>	qHsaCED0048106	102	11:102666225-102667412
<i>TIMP-1</i>	qHsaCED0042919	70	X:47442907-47444405
<i>RELA (p65)</i>	qHsaCED0046951	105	11:65429428-65429652
<i>TGF-β1</i>	qHsaCID0017026	143	19:41850663-41854265
<i>SMAD2</i>	qHsaCID0022031	115	18:45368239-45371772
<i>SMAD3</i>	qHsaCID0008503	138	15:67459117-67473620
<i>SMAD4</i>	qHsaCID0015670	110	18:48573582-48575111

## V. Évaluation d'activités biologiques *in vitro* sur des bactéries du microbiote cutané

### A. Souches bactériennes et culture

#### 1. Souches d'étude : *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Cutibacterium acnes*

Les souches *Staphylococcus epidermidis* MFP04 et *Staphylococcus aureus* MFP03, isolées de peau saine, sont utilisées dans cette étude (Hillion, 2013). Deux souches de *Cutibacterium acnes* sont également utilisées lors de cette étude : la souche acnéique de ribotype 4 (RT4) et de phylotype IA<sub>1</sub> : HL045PA1/HM-516, et la souche non acnéique de ribotype 6 (RT6) et de phylotype II : HL110PA3/HM-554. Ces souches ont été isolées par Fitz-Gibbon *et al.* (2013) et diffusées par « BEI Resources American Type Culture Collection » (Virginia, United States).

Les souches bactériennes sont stockées à -80°C sous forme de cryobilles.

#### 2. Milieux de culture

*S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03 sont cultivées en milieu TSB (« Tryptic Soy Broth »). *C. acnes* RT6 (HM-554) est cultivée en milieu RCM (« Reinforced Clostridial Medium ») PolyPeptone (PP) et *C. acnes* RT4 (HM-516) en milieu RCM PAstone (PA). Les compositions des milieux de culture sont présentées dans le Tableau XI. Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage de 20 min à 120°C sous pression de vapeur saturante. Afin d'éviter la réaction de Maillard et de déstabiliser l'ensemble du milieu, l'ajout de composés thermosensibles comme le glucose est effectué, après filtration de la solution à ajouter sur 0,22 µm, en conditions stériles après autoclavage.

Tableau XI : Composition des milieux TSB et RCM (PP ou PA)

		Fournisseur	g/L
<b>Milieu TSB</b>	Bouillon Tryptone Soja	Sigma-Aldrich	7,5
	Extrait de levure	Fisher Scientific	13
	Polypeptone (PP) ou pastone (PA)	Biomérieux	10
	Glucose	Sigma-Aldrich	5
<b>Milieu RCM</b>	Amidon soluble	Sigma-Aldrich	1
	Chlorure de sodium	Fisher Scientific	5
	Acétate de sodium	AnalaR NormaPur	3
	Chlorhydrate de L-cystéine	Sigma-Aldrich	0,5

### 3. Conditions de pré-culture solides et liquides

Une gélose TSA (« Tryptic Soy Agar », Sigma-Aldrich) estensemencée à l'aide d'une cryobille de *S. epidermidis* MFP04 ou de *S. aureus* MFP03. Après incubation à 37°C, en condition statique aérobie toute la nuit (O/N), la boîte de Pétri peut-être stockée à 4°C afin de l'utiliser pour l'ensemble des tests physiologiques dans un délai de 1 mois. Une colonie est prélevée à l'aide d'une oese et dispersée dans 10 ml de milieu TSB dans un erlenmeyer stérile de 100 ml (afin de respecter un rapport de 1/10<sup>e</sup> pour être dans des conditions aérobies). La pré-culture liquide est incubée à 37°C sous agitation à 180 rpm toute la nuit.

Une gélose BHI (« Brain Heart Infusion ») estensemencée à l'aide d'une cryobille de *C. acnes* RT6 (HM-554), et une gélose RCM PA à l'aide d'une cryobille de *C. acnes* RT4 (HM-516). Après incubation des souches en condition anaérobie, obtenue à l'aide d'un sachet BD GasPack™ EZ pouch systems (BD) pendant 72 h, une colonie est alors prélevée à l'aide d'une oese et dispersée dans 15 ml de RCM PA ou RCM PP selon le ribotype étudié, dans un falcon stérile de 15 ml. Cette pré-culture liquide est alors incubée à 37°C en étuve statique pendant 72 h (condition anaérobie).

### 4. Préparation des fractions testées

Les fractions issues d'*Ulva* sp. par EAE sont solubilisées extemporanément dans le milieu de culture correspondant au milieu de la souche étudiée, c'est-à-dire dans du TSB pour les souches *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03, dans du RCM PA pour *C. acnes* RT4 (HM-516) et dans du RCM PP pour *C. acnes* RT6 (HM-554), pour une concentration finale d'étude de 1000 µg/ml. Les échantillons sont ensuite filtrés sur 0,22 µm.

## B. Suivi de croissance bactérienne

Les effets des fractions issues d'*Ulva* sp. par EAE sur les croissances bactériennes de *S. epidermidis* MFP04, *S. aureus* MFP03, *C. acnes* RT4 (HM-516) et RT6 (HM-554) sont étudiés.

Une culture à DO<sub>580 nm</sub> = 0,08 (Spectrophotomètre spectronic 601) est effectuée par dilution de la pré-culture liquide etensemencée en présence ou en l'absence des fractions à 1000 µg/ml sur une plaque 96 puits en polystyrène (NUNC) pour les souches *C. acnes* et une plaque « Bioscreen HoneyComb » (Thermo Scientific) pour les souches *S. aureus* et *S. epidermidis*.

La plaque dans le cas du suivi de croissance de *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03 est insérée dans un lecteur de microplaque (Bioscreen C). La DO est alors mesurée à 580 nm toutes les 15 min pendant 24 h.

La plaque dans le cas du suivi de croissance de *C. acnes* RT4 (HM-516) est préalablement incubée 2 h dans une enceinte d'anaérobiose (Whitley A85 Workstation) avant d'être entourée de silicone et parafilm, et d'être insérée dans un lecteur de microplaque (TECAN Spark 10 M). La DO est mesurée automatiquement à 580 nm toutes les 2 h pendant 72 h. Le suivi de croissance de *C. acnes* RT6 (HM-554) est réalisé manuellement par mesure de la DO à 580 nm toutes les 2 h pendant 72 dans un lecteur de microplaque (TECAN Spark 10 M). Les plaques de suivi de croissance de *C. acnes* RT6 (HM-554), en dehors des mesures, sont incubées dans une enceinte d'anaérobiose (Whitley A85 Workstation). L'anaérobiose est obtenue par un mélange gazeux CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>.

L'effet des fractions sur la croissance bactérienne est évalué en considérant le temps de génération correspondant au temps nécessaire au doublement du nombre de bactéries. Le temps de génération (G) des souches bactériennes est calculé selon l'équation suivante et exprimé en minutes pour les staphylocoques et en heures pour les *Cutibacterium* :

$$G \text{ (unité de temps)} = \frac{\ln 2}{\text{Pente de la courbe de croissance en phase exponentielle}} \times 100.$$

### C. Étude de la formation de biofilm par microscopie confocale à balayage laser

---

Les bactéries sont pré-cultivées comme décrit précédemment (Chapitre 2 - V.A.3 p. 160). Les cultures bactériennes sont réalisées à une DO<sub>580 nm</sub> = 0,08 (Spectrophotomètre spectronic 601) en présence ou en l'absence des fractions issues d'*Ulva* sp. à 1000 µg/ml :

- En aérobiose dans du TSB pendant 16 h pour les souches *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03.
- En anaérobiose pendant 72 h pour les souches *C. acnes* RT6 (HM-554) dans du RCM PP et RT4 (HM-516) dans du RCM PA.

Ainsi, la biomasse bactérienne est récupérée en phase stationnaire et centrifugée à TA pendant 5 min à 8000 g. Un lavage de la biomasse est effectué avec de l'eau physiologique (NaCl à 9 g/L) afin d'éliminer toute trace de milieux de culture et de fractions issues d'*Ulva* sp.. La biomasse est à nouveau centrifugée à TA pendant 5 min à 8000 g. Les biomasses bactériennes sont resuspendues dans de l'eau physiologique à une DO<sub>580 nm</sub> = 0,1 pour *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03, et à une DO<sub>580 nm</sub> = 1 pour *C. acnes* RT4 et RT6 (Spectrophotomètre spectronic 601). 200 µl de cette suspension bactérienne de *S. epidermidis* MFP04 ou de *S. aureus* MFP03, ou 1 ml de suspension bactérienne de *C. acnes* sont déposés par puits dans des plaques 24 puits à fond de verre (Sensoplate, Greiner Bio-one). Les dépôts des suspensions bactériennes sont réalisés en triplicat pour chaque condition étudiée à partir d'au moins quatre expériences indépendantes pour chaque souche.

Afin de permettre l'adhésion des bactéries, la plaque est incubée 2 h à 37°C en aérobiose pour *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03, et en anaérobiose pour *C. acnes* RT4 et RT6.

Après l'adhésion des bactéries au support, du milieu de culture neuf est ajouté (200 µl/puits de TSB + 2% glucose pour *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03, et 1 ml/puits de RCM PP pour *C. acnes* RT6 et de RCM PA pour *C. acnes* RT4). Afin d'obtenir un biofilm mature, la plaque est alors incubée 46 h à 37°C en aérobiose pour *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03, et 70 h en anaérobiose pour *C. acnes*.

Afin d'observer les biofilms, les bactéries sont marquées au « SYTO9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain » (ThermoFisher) dilué au 5000<sup>e</sup> dans l'eau physiologique (300 µl/puits). La plaque est incubée 15 min à l'obscurité à TA. De l'eau physiologique (300 µl/puits) et du « ProLong™ Diamond Antifade Mountant » (1 goutte/puits, Thermo Fisher Scientific) sont ajoutés dans chaque puit. Après 24 h à l'obscurité à TA, la plaque est stockée à 4°C avant analyse (1 mois maximum).

Les biofilms sont observés au microscope confocal à balayage laser LSM710 (Zeiss®) avec un objectif x63 à immersion à huile. Le SYTO9 est excité à 485 nm et l'émission est mesurée sur une bande passante de 495 à 550 nm. Afin d'étudier l'ensemble du biofilm, 4 prises de vues par puits sont réalisées avec un pas de 1 µm.

Les images 3D sont reconstituées grâce au logiciel Zen® 2009 (Zeiss®) et analysées avec le logiciel ImageJ et à l'aide du plugin COMSTAT 2.1 (Heydorn *et al.*, 2000). Les données analysées correspondent au biovolume (µm<sup>3</sup>/µm<sup>2</sup>), à l'épaisseur moyenne (µm) et au coefficient de rugosité (Ra).

## D. Étude de la cytotoxicité de *S. epidermidis* et *S. aureus* et du potentiel inflammatoire de *C. acnes* sur les kératinocytes

---

### 1. Culture des kératinocytes

La lignée cellulaire de kératinocytes HaCaT (CLS Cell Lines Service, 300493) est utilisée dans cette étude. Ces cellules sont issues de la peau d'un homme de type caucasien de 62 ans.

Les kératinocytes sont cultivés en flasque de 25 cm<sup>2</sup> avec du milieu DMEM (DMEM-F12, Lonza) supplémenté avec 10% (v/v) de SVF (Lonza) et 1% (v/v) d'une solution de pénicilline/streptomycine. Les cellules sont cultivées dans un incubateur à température contrôlée de 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont entretenues en renouvelant le milieu de culture jusqu'à atteindre 80% de confluence. Les cellules sont rincées avec du PBS sans calcium ni magnésium (Lonza) avant d'être repiquées par trypsination avec 2 ml d'une solution de trypsine-EDTA (Gibco).

Pour les analyses, les cellules sont ensemencées sur une plaque 24 puits. Pour cela, elles sont resuspendues à une concentration de 2,5.10<sup>5</sup> cellules/ml et 1 ml/puits est déposé.

### 2. Infection des cellules

L'infection des cellules est réalisée dans des plaques 24 puits. Vingt-quatre heures avant l'infection, le milieu de culture est remplacé par du milieu de culture non supplémenté de SVF et sans antibiotique (DMEM seul).

Les cultures bactériennes, réalisées en présence des fractions issues d'*Ulva* sp. à 1000 µg/ml, sont récupérées en phase stationnaire et centrifugées à 7500 g pendant 10 min. Le surnageant est alors éliminé et le culot bactérien est resuspendu dans le même volume d'eau physiologique (5 ml pour *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03, et 15 ml pour *C. acnes* RT4 et RT6). Une centrifugation à 7500 g pendant 10 min est alors effectuée afin d'éliminer toute trace de culture. Les culots bactériens sont resuspendus dans le même volume d'eau physiologique que précédemment. La DO<sub>580 nm</sub> des cultures bactériennes est alors mesurée afin d'ensemencer dans du DMEM seul et d'obtenir une MOI (« Multiplicity Of Infection ») de 10 pour *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03, et une MOI de 50 pour *C. acnes* RT4 et RT6.

Après infection, les plaques sont alors incubées pendant 16 h pour *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03, et 18 h pour *C. acnes* RT4 (HM-516) et RT6 (HM-554).

### 3. Mesure de la cytotoxicité par le test de la LDH

Le potentiel cytotoxique des bactéries *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03, préalablement cultivées en présence des fractions issues d'*Ulva* sp. à 1000 µg/ml, sur les kératinocytes HaCaT est mesuré par le dosage de la LDH grâce au kit « Pierce™ LDH Cytotoxicity » (ThermoScientific, 88954).

De manière analogue au kit Promega (Chapitre 2 - IV.B.2, p. 151), 45 min avant la réalisation du test, 10 µl/puits de tampon de lyse sont ajoutés dans des puits servant de contrôle positif et les kératinocytes sont remis à incuber. À la fin de la période d'infection des cellules, 50 µl de surnageant de culture sont prélevés et déposés dans une nouvelle plaque 96 puits. Le dosage est réalisé selon les recommandations du fournisseur. Pour cela, aux 50 µl de surnageants de culture sont ajoutés 50 µl/puits de mélange réactionnel. La plaque est ensuite légèrement tapotée afin d'homogénéiser le mélange et mise à incuber 30 min à TA à l'obscurité. Ensuite, 50 µl de solution stop sont ajoutés dans chaque puits. Le mélange est homogénéisé par tapotement de la plaque. L'absorbance (DO) est mesurée à 490 et 680 nm. Afin de déterminer l'activité de la LDH, la valeur d'absorbance à 680 nm (signal de fond) est soustraite à la valeur d'absorbance à 490 nm.

Le pourcentage de cytotoxicité exercé sur les kératinocytes HaCaT par les staphylocoques exposés ou non aux fractions lors de leur croissance bactérienne est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage de variation (\%)} = \frac{DO_{490} (\text{Bactérie exposée}) - DO_{680} (\text{Bactérie exposée})}{DO_{490} (\text{Bactérie non exposée}) - DO_{680} (\text{Bactérie non exposée})} \times 100.$$

### 4. Mesure du potentiel inflammatoire par dosage de l'IL-8

La réponse inflammatoire des kératinocytes HaCaT induite par *C. acnes* RT4 et RT6, préalablement cultivées en présence des fractions issues d'*Ulva* sp. à 1000 µg/ml, est évaluée par le dosage de l'IL-8 grâce au kit « Human IL-8 ELISA kit » (Thermoscientific, KHC0081).

À la fin des 18 h d'infection, les surnageants de culture cellulaire sont récupérés et stockés à -80°C avant analyse. Les échantillons à analyser sont préalablement dilués au 1/10<sup>e</sup> dans du tampon d'essai fourni par le fabricant. Le dosage est réalisé selon les indications du fournisseur.

Pour cela, 50 µl d'échantillons ou de standard sont ajoutés par puits. Ensuite, 50 µl d'une solution conjuguée d'IL-8 humaine-Biotine sont ajoutés par puits. Le mélange est incubé 1 h 30 à TA.

Puis, la solution est aspirée vigoureusement et les puits sont rincés 4 fois avec 100 µl de tampon de lavage 1X. 100 µl d'une solution de Streptavidine-HRP 1X sont ajoutés par puits et incubés pendant 30 min à TA. La solution est aspirée vigoureusement et les puits sont à nouveau rincés 4 fois avec 100 µl de tampon de lavage 1X. Après, 100 µl de solution de TMB sont ajoutés par puits et incubés pendant 30 min à TA à l'obscurité. Enfin, 100 µl de solution stop (HCl 1 à 5% massique) sont ajoutés par puits et l'absorbance est mesurée à 450 nm. Des puits de cellules non infectées donnent le taux de libération d'IL-8 basal des kératinocytes HaCaT.

Les quantités d'IL-8 contenues dans les surnageants de culture cellulaire sont déterminées à partir d'une gamme étalon réalisée à partir de l'« Human IL-8 standard » (0 à 1000 pg/ml). La réponse inflammatoire des kératinocytes HaCaT induite par *C. acnes* exposée ou non aux fractions lors de leur croissance bactérienne est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage de variation (\%)} = \frac{\text{Concentration IL-8 (Bactérie exposée)}}{\text{Concentration IL-8 (Bactérie non exposée)}} \times 100.$$

## VI. Analyses statistiques

Les données sont présentées sous la forme de moyenne  $\pm$  erreur standard. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant Addinsoft 2020. XLSTAT 2020 : Data Analysis and Statistical Software for Microsoft Excel. Paris, France (2020). Les analyses statistiques de la composition biochimique et en monosaccharides ont été faites par une ANOVA (« ANalysis Of VAriance ») paramétrique suivie du test de Tukey par paire au niveau de  $p < 0,05$ .

La distribution normale des données d'activités biologiques est évaluée par le test de Shapiro-Wilk avec un niveau de confiance de 95%. Les différences significatives entre les contrôles et les échantillons sont analysées par le test-*t* de Student (indépendant, bilatéral) pour les données suivant une loi normale et un test de Mann-Whitney dans le cas contraire. Les différences significatives en comparaison avec le contrôle, selon les résultats du test statistique, sont indiquées par des astérisques : \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$ .

# Chapitre 3

**Extraction, purification et  
dépolymérisation d'ulvanes de  
la macroalgue *Ulva* sp. et tests  
d'activités biologiques**

---

**Comparaison de la macération et de l'EAE**





# Chapitre 3 : Extraction, purification et dépolymérisation d'ulvanes de la macroalgue *Ulva* sp. et tests d'activités biologiques

## I. Introduction

L'algue verte du genre *Ulva* sp. représente une biomasse conséquente des côtes littorales européennes en raison de sa prolifération. Néanmoins, les marées vertes dues à l'importante eutrophisation marine ont un impact négatif sur l'environnement et l'économie locale, notamment en Bretagne (Briand, 1991 ; Charlier *et al.*, 2007). À l'heure actuelle, cette biomasse est faiblement valorisée en Bretagne et est utilisée comme amendement pour les sols, pour la nutrition animale ou encore simplement dégradée par combustion ou par dégradation naturelle (Charlier *et al.*, 2007). L'exploitation et la valorisation de cette ressource naturelle proliférative apparaît comme essentielle. De ce fait, il y a donc un intérêt grandissant dans l'extraction, le fractionnement et la purification de composés à haute valeur ajoutée issus de l'algue verte *Ulva* sp..

Sa paroi cellulaire se compose principalement de polysaccharides constituant son squelette (cellulose, hémicellulose, mannanes et xylanes) et sa phase matricielle (ulvanes, xyloarabinogalactanes et glucuronoxylorhamnanes) (Lahaye *et al.*, 1994 ; Lahaye & Ray, 1995). Ses polysaccharides sulfatés anioniques connus sous le nom d'ulvanes sont composés principalement de rhamnose sulfaté, d'acides uroniques (glucuronique et iduronique) et de xylose (Lahaye & Robic, 2007).

Traditionnellement, l'extraction des ulvanes est effectuée par extraction aqueuse à haute température aussi appelée macération, en présence de chélateurs ou d'acides utilisés pour détruire la paroi algale. Cette extraction aqueuse est couramment suivie d'une précipitation éthanolique (Kidgell *et al.*, 2019). Récemment, une nouvelle technologie appelée Extraction Assistée par Enzyme (EAE) a été utilisée pour améliorer l'extraction des polysaccharides en termes de rendements, temps, coût et consommation d'énergie (Hardouin *et al.*, 2014a ; Garcia-Vaquero *et al.*, 2017 ; Terme *et al.*, 2020).

Les ulvanes issus d'*Ulva* sp., ont démontré *in vitro* et *in vivo* des activités biologiques intéressantes en santé humaine comme l'activité antioxydante, anticancéreuse, anticoagulante, anti-hyperlipidémique, antivirale ou d'immunomodulation (Jenkins, 2002 ; Qi *et al.*, 2005a ; Shao *et al.*, 2013 ; Peasura *et al.*, 2015 ; Hardouin *et al.*, 2016 ; Pimentel *et al.*, 2017 ; Kidgell *et al.*, 2019 ; Adrien *et al.*, 2019 ; Mo'o *et al.*, 2020). Cependant, à l'heure actuelle, peu d'études ont rapporté les effets de composés de l'algue verte *Ulva* sp. pour des applications cosméceutiques (Adrien *et al.*, 2017b ; Bodin *et al.*, 2020) et aucune d'entre elles ne fait part de l'utilisation de l'EAE comme procédé d'extraction de ces composés.

Ainsi, le premier objectif de ce chapitre est la production de fractions d'ulvanes bruts à partir de la macroalgue verte *Ulva* sp. par application du procédé d'éco-extraction connu sous le nom d'EAE en utilisant l'enzyme Protamex®, par comparaison avec le procédé classique de macération. Le second objectif de ce travail est la purification des ulvanes bruts à partir de différents procédés mis en œuvre : la précipitation éthanolique, la dialyse, et la saturation au sulfate d'ammonium suivie de précipitation éthanolique et de dialyse, afin d'obtenir des fractions de compositions biochimiques différentes, les plus riches en ulvanes. Le troisième objectif est la comparaison de deux procédés de dépolymérisation (hydrolyse radicalaire et hydrolyse acide) appliqués à des fractions d'ulvanes purifiés pour l'obtention de fractions de bas Poids Moléculaires (PM). Ceci a pour but de pouvoir étudier la relation structure/fonction des ulvanes en lien avec leurs potentielles activités biologiques. La comparaison des fractions produites s'appuie sur les rendements et les taux de recouvrement de polysaccharides obtenus mais principalement sur des paramètres qualitatifs tels que la composition biochimique, monosaccharidique et la distribution des PM. Enfin, le dernier objectif est d'étudier *in vitro* des activités biologiques (antioxydante, anti-inflammatoire et anti-vieillessement) des différentes fractions produites issus de macération et d'EAE par des tests biochimiques dans le cadre de stratégies de réparation cutanée et/ou anti-vieillessement pour une application en cosmétique.

## II. Résultats

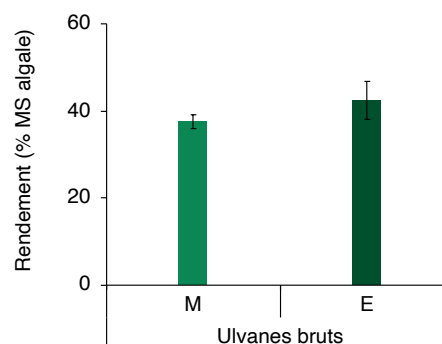
### A. Extraction et purification des ulvanes : production de fractions d'ulvanes

#### 1. Rendements d'extraction des ulvanes et taux de recouvrement après purification

Les procédés détaillés de production des ulvanes bruts et de purification sont présentés sur la Figure 60 (p. 137) et sur l'intercalaire joint.

Les rendements de production des ulvanes bruts suite à une extraction aqueuse par macération (M) ou par EAE (E), suivie d'une précipitation éthanolique, sont exprimés en pourcentage de matière sèche algale (% MS algale) et présentés sur la Figure 73.

L'EAE, suivie d'une précipitation éthanolique, permet d'aboutir à un rendement de production d'ulvanes bruts de  $42,5 \pm 4,4\%$  (UE). La macération, suivie d'une précipitation éthanolique, permet d'obtenir un rendement de production de  $37,5 \pm 1,5\%$  (UM). L'EAE permet donc d'obtenir un rendement de production d'ulvanes bruts supérieur à la macération, même si non significativement différent.



**Figure 73 : Rendements de production des ulvanes bruts issus de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E)**

Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards ( $n=3$ ). La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student.

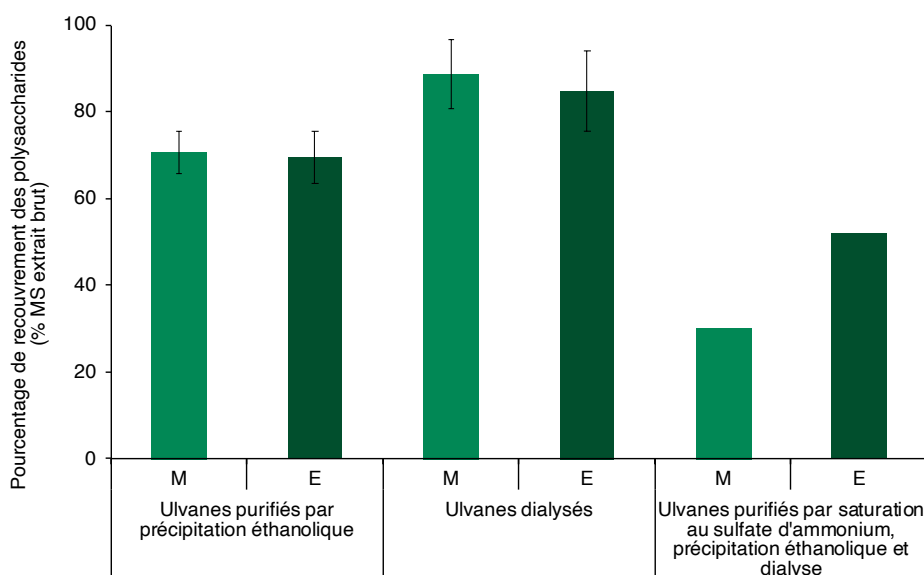
Les ulvanes bruts ont ensuite été purifiés selon différents procédés présentés précédemment : la précipitation éthanolique, la dialyse, ou la saturation au sulfate d'ammonium suivie de précipitation éthanolique et dialyse (Figure 60, p. 137) afin d'enrichir le contenu des fractions en ulvanes.

Pour rappel, la précipitation éthanolique est un procédé de récupération des sucres tandis que la saturation au sulfate d'ammonium est un procédé d'élimination des protéines.

Les pourcentages de recouvrement de polysaccharides selon le procédé de purification employé sont présentés sur la Figure 74 et sont exprimés en pourcentage de matière sèche de l'extrait brut, c'est-à-dire d'ulvanes bruts (% MS extrait brut).

Les ulvanes purifiés par précipitation éthanolique et les ulvanes dialysés présentent de forts taux de recouvrement des polysaccharides. Les ulvanes purifiés par précipitation éthanolique issus de la macération (M) et de l'EAE (E) ont des pourcentages de recouvrement de  $70,6 \pm 4,8\%$  (PP-UM) et  $69,5 \pm 6,1\%$  (PP-UE) respectivement. Les ulvanes dialysés issus de la macération (M) et de l'EAE (E) ont des pourcentages de recouvrement de  $88,6 \pm 7,9\%$  (DS-UM) et  $84,7 \pm 9,1\%$  (DS-UE) respectivement.

Les ulvanes purifiés par saturation au sulfate d'ammonium suivie de précipitation éthanolique et dialyse n'ont été produits qu'une fois et leurs pourcentages de recouvrement sont plus faibles que ceux des autres procédés employés. En effet, la Figure 74 met en évidence que les ulvanes purifiés par saturation au sulfate d'ammonium issus de macération (M) ont un pourcentage de recouvrement de  $30,0\%$  (AS-PP-DS-UM) et ceux issus de l'EAE (E) de  $51,9\%$  (AS-PP-DS-UE).



**Figure 74 : Taux de recouvrement des polysaccharides obtenus par les différents procédés de purification employés à partir des ulvanes bruts issus de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E)**

Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards ( $n=4$  pour les ulvanes purifiés par précipitation éthanolique,  $n=2$  pour les ulvanes dialysés et  $n=1$  pour les ulvanes purifiés par saturation au sulfate d'ammonium). La significativité entre macération et EAE pour les ulvanes purifiés par précipitation éthanolique est testée à l'aide d'un test  $t$  de Student.

## 2. Caractérisation biochimique et monosaccharidique des ulvanes bruts et purifiés

### a) Composition biochimique des ulvanes bruts et purifiés

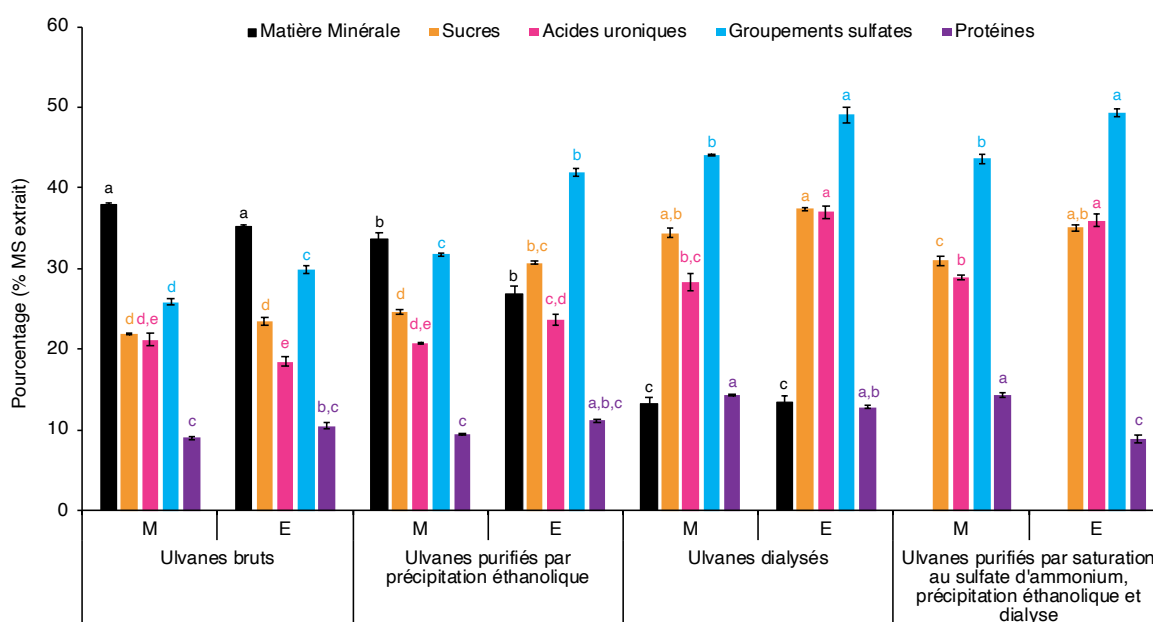
La Figure 75 montre la composition biochimique des ulvanes bruts et purifiés par précipitation éthanolique, dialyse ou suite à la purification par saturation au sulfate d'ammonium.

Sur cette figure, les pourcentages de matière minérale, sucres, acides uroniques, groupements sulfates et protéines des fractions sont exprimés en pourcentage de matière sèche de l'extrait analysé (% MS extrait).

La composition en matière minérale des ulvanes purifiés par saturation au sulfate d'ammonium suivie précipitation éthanolique et dialyse n'a pu être déterminée en raison de la faible quantité de matière produite.

Les ulvanes bruts et les ulvanes purifiés sont des échantillons riches en sucres (21,9 à 37,4%), acides uroniques (18,5 à 37,0%) et groupements sulfates (25,9 à 49,4%).

Les ulvanes bruts présentent le contenu le plus élevé en matière minérale :  $38,0 \pm 0,2\%$  pour UM et  $35,2 \pm 0,2\%$  pour UE. Le plus faible contenu en matière minérale est retrouvé dans les ulvanes dialysés (DS-UM :  $13,2 \pm 0,8\%$  et DS-UE :  $13,4 \pm 0,8\%$ ). Ce faible taux de matière minérale correspond à l'élimination des sels durant le procédé de dialyse. Il est également intéressant de noter que les ulvanes purifiés par précipitation éthanolique présentent également un contenu statistiquement plus faible en matière minérale que les ulvanes bruts respectifs ( $p < 0,05$ ) avec une baisse de 4,3% pour PP-UM et 8,4% pour PP-UE. Ces deux procédés de purification (précipitation éthanolique et dialyse) aboutissent donc à la réduction significative ( $p < 0,05$ ) de matière minérale dans les échantillons.



**Figure 75 : Composition biochimique (% MS extrait) des ulvanes bruts et purifiés issus de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E)**

Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards ( $n=3$  au minimum). Les lettres en considérant une série (matière minérale, sucres, acides uroniques, groupements sulfates ou protéines), lorsque différentes, représentent les différences significatives selon le test de Tukey par paires *a posteriori* d'une ANOVA, en considérant  $p < 0,05$ .

Les trois procédés de purification aboutissent à l'augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la teneur en sucres des fractions en comparaison avec les ulvanes bruts (de +7,2% à +13,9%), excepté pour la fraction PP-UM où l'augmentation n'est pas significative (+2,8%). La composition en sucres est statistiquement plus élevée ( $p < 0,05$ ) dans les ulvanes dialysés issus d'EAE (DS-UE :  $37,4\% \pm 0,2\%$ ) que dans les ulvanes purifiés par précipitation éthanolique issues d'EAE (PP-UE :  $30,7\% \pm 0,2\%$ ).

Les ulvanes bruts et les ulvanes purifiés issus d'EAE présentent une plus forte teneur en sucres que ceux issus de macération (significatif,  $p < 0,05$ , +6,0% pour les ulvanes purifiés par précipitation éthanolique et +4,1% pour les ulvanes purifiés par saturation au sulfate d'ammonium).

À nouveau, les trois procédés de purification aboutissent à l'augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la teneur en acides uroniques des fractions en comparaison avec les ulvanes bruts (de +5,2% à +18,5%), excepté pour le procédé de précipitation éthanolique issu de macération (PP-UM) où une diminution non significative est observée. Les ulvanes dialysés issus de macération et d'EAE présentent une teneur en acides uroniques (DS-UM : 28,3% et DS-UE : 37,0%) statistiquement plus élevée ( $p < 0,05$ ) que les ulvanes purifiés par précipitation éthanolique (PP-UM : 20,8% et PP-UE : 23,7%). La composition en acides uroniques est similaire entre les ulvanes dialysés et les ulvanes purifiés par saturation au sulfate d'ammonium (AS-PP-DS-UM : 29,0% et AS-PP-DS-UE : 36,0%). Aussi, les ulvanes purifiés issus d'EAE présentent une plus forte teneur en acides uroniques que ceux issus de macération (significatif,  $p < 0,05$ , +8,7% pour les fractions dialysées).

Les trois procédés de purification aboutissent à un enrichissement significatif ( $p < 0,05$ ) de la composition en groupements sulfates des fractions en comparaison avec les ulvanes bruts (de +5,9% à +19,5%). La teneur en groupement sulfates des ulvanes dialysés et des ulvanes purifiés par saturation au sulfate d'ammonium (43 à 44% issues de macération et 49% issues d'EAE) est également significativement ( $p < 0,05$ ) plus importante que celles des ulvanes purifiés par précipitation éthanolique (PP-UM : 31,8% et PP-UE : 41,9%). Les ulvanes bruts et les ulvanes purifiés issus d'EAE présentent une teneur significativement ( $p < 0,05$ ) plus élevée en groupement sulfates que ceux issus de macération (de +4,0 à +10,1%).

Les ulvanes bruts et purifiés présentent des teneurs en protéines comprises entre 8,9% et 14,3%. Toutefois, aucune tendance d'appauvrissement de cette teneur en protéine n'est indiquée par les procédés de purification.

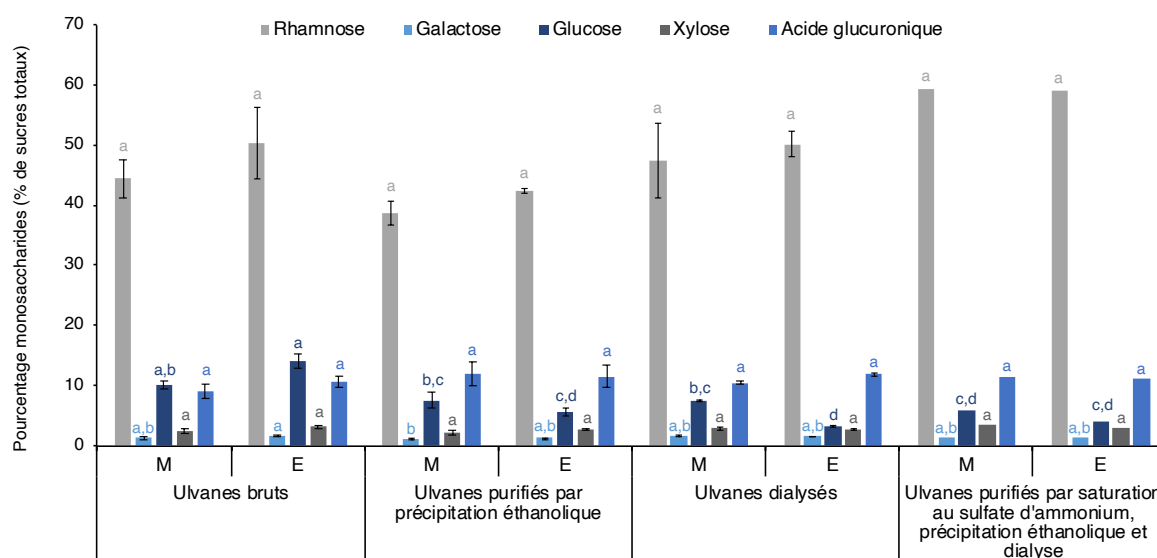
### **b) Composition monosaccharidique des ulvanes bruts et purifiés**

Les compositions en monosaccharides (rhamnose, galactose, glucose, xylose et acide glucuronique) des ulvanes bruts et purifiés par précipitation éthanolique, dialyse ou suite à la purification par saturation au sulfate d'ammonium suivie de précipitation éthanolique et dialyse, sont présentées sur la Figure 76. La composition en monosaccharides est exprimée en pourcentage de sucres totaux des échantillons analysés (g/100 g de sucres totaux).

Les monosaccharides suivants : fructose, glucosamine, ribose, mannose et arabinose sont faiblement présents (< 1%), voire non détectés dans les échantillons analysés (données non montrées). L'acide iduronique, caractéristique de la composition des ulvanes, n'a pu être analysé en raison de l'absence de standard.

Le rhamnose (38,8 à 59,4%), le glucose (3,3 à 14%) et l'acide glucuronique (9,1 à 11,9%) sont les monosaccharides les plus représentatifs des ulvanes bruts et purifiés.

Le rhamnose représente le monosaccharide majoritaire des ulvanes bruts et purifiés, soit environ la moitié du contenu en sucres totaux de ces échantillons. La fraction la plus abondante en rhamnose est celle d'ulvanes purifiés par saturation au sulfate d'ammonium (59% des sucres totaux). Les ulvanes bruts, les ulvanes purifiés par précipitation éthanolique et les ulvanes dialysés issus d'EAE présentent une teneur en rhamnose supérieure à ceux issus de macération bien que non significativement différente.



**Figure 76 : Composition en monosaccharides (% de sucres totaux) des ulvanes bruts et purifiés, issus de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E)**

Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards ( $n=3$  pour les ulvanes bruts,  $n=4$  pour les ulvanes purifiés par précipitation éthanolique,  $n=2$  pour les ulvanes dialysés et  $n=1$  pour les ulvanes purifiés par saturation au sulfate d'ammonium). Les lettres en considérant une série (rhamnose, galactose, glucose, xylose ou acide glucuronique) lorsque différentes, représentent les différences significatives selon le test de Tukey par paires *a posteriori* d'une ANOVA, en considérant  $p < 0,05$ .

Le galactose et le xylose sont faiblement détectés dans les ulvanes bruts et purifiés puisqu'ils représentent seulement 1,1 à 1,6% et 2,2 à 3,6% des sucres totaux respectivement.

Les trois procédés de purification aboutissent à la diminution de la teneur en glucose, par comparaison aux ulvanes bruts. Cette diminution est significative ( $p < 0,05$ ) pour les ulvanes purifiés par saturation au sulfate d'ammonium issus de macération (-4,3%) et d'EAE (-10%), et pour les ulvanes purifiés par précipitation éthanolique et les ulvanes dialysés issus d'EAE (-6,4%).

L'acide glucuronique représente environ 10% du contenu en sucres totaux des ulvanes bruts et purifiés quel que soit le procédé aqueux d'extraction initialement employé (macération ou EAE).

Pour conclure, les fractions obtenues sont riches en polysaccharides anioniques sulfatés de par leur composition biochimique particulière. De plus, les trois procédés de purification employés aboutissent, en comparaison avec l'extrait brut, à un enrichissement en sucres et acides uroniques (significatif, sauf pour le procédé de précipitation éthanolique issu de macération) et en groupements sulfates (significatif).

Le procédé de dialyse correspond au procédé le plus efficace pour un taux de recouvrement maximal des polysaccharides et un enrichissement élevé en ces composés (sucres, acides uroniques et sulfates) à partir de l'extrait brut. Les teneurs importantes en sucres, acides uroniques et groupements sulfates au sein des fractions confirment la présence des ulvanes. Aussi, l'EAE en comparaison de la macération entraîne une augmentation, parfois significative, de la composition en sucres (notamment en rhamnose), acides uroniques et groupements sulfates.

## B. Dépolymérisation des ulvanes : production de fractions d'oligo-ulvanes

La dépolymérisation a pour objectif principal la production d'ulvanes de bas poids moléculaires (oligo-ulvanes) potentiellement plus bioactifs.

### 1. Suivi de la dépolymérisation par Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance (HPSEC)

Les conditions de dépolymérisation par hydrolyse radicalaire et acide (température et durée) des ulvanes purifiés par précipitation éthanolique (**PP-UM** et **PP-UE**) sont récapitulées dans le Tableau XII. Les colonnes chromatographiques utilisées en HPSEC pour le suivi et l'analyse sont également indiquées.

Tableau XII : Conditions de dépolymérisation des ulvanes et colonnes chromatographiques

Fractions		Température	Durée (h)	Colonnes chromatographiques
Ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	DEP-H1	35°C	1	
	DEP-H3	Étape 1 : 35°C	1	G6000PW <sub>XL</sub> G4000PW <sub>XL</sub>
		Étape 2 : 50°C	2	
	DEP-H7-1	Étape 1 : 35°C	1	G3000PW <sub>XL</sub>
		Étape 2 : 50°C	6	
	DEP-H7-2	50°C	7	
	DEP-H24	50°C	24	
DEP-HD	50°C	24	G3000PW <sub>XL</sub>	
Ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide	DEP-AD	80°C	24	

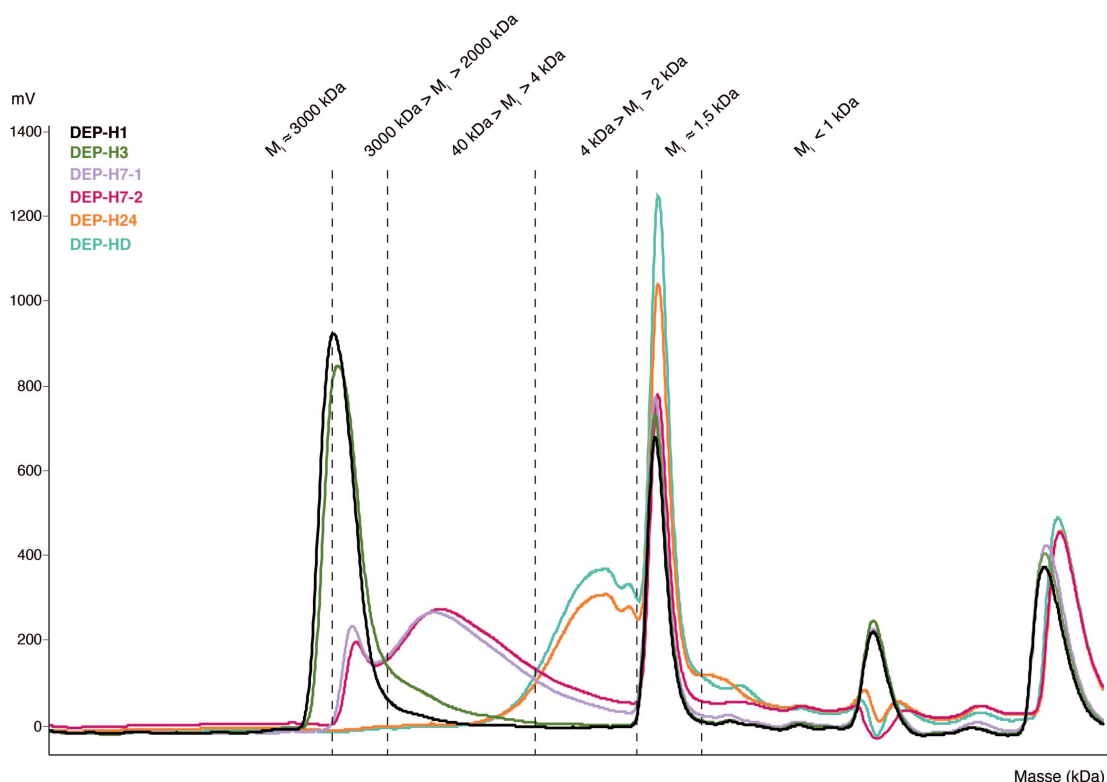
Les fractions dépolymérisées par hydrolyse radicalaire sont nommées : « DEP-H » pour celles du suivi de la dépolymérisation (temps et température), et « DEP-HD » pour les fractions dépolymérisées par hydrolyse radicalaire utilisées dans la suite des expérimentations.

La distribution du Poids Moléculaire (PM) des polysaccharides est déterminée par HPSEC (Figures 77 et 78) et par l'utilisation de standards de dextrans.



Le Tableau XIII met en évidence que les ulvanes purifiés par précipitation éthanolique (PP-UM et PP-UE) sont constitués majoritairement de polysaccharides de hauts PM (environ 3000 kDa). Les indices de polydispersité ( $I_p$ ) de ces fractions sont relativement faibles (1,9 pour PP-UM et 1,4 pour PP-UE) et confirment un profil de taille homogène dans ces échantillons.

La dépolymérisation des ulvanes par le peroxyde d'hydrogène, utilisée dans les travaux de Pengzhan *et al.* (2004), a été étudiée afin de mesurer l'influence du temps et de la température sur la dépolymérisation (Figure 77 et Tableau XIII).



**Figure 77 : Chromatogramme HPSEC modifié du suivi de dépolymérisation des ulvanes par hydrolyse radicalaire**

Colonne utilisée : G6000PW<sub>XL</sub> ; débit d'élution : 0,7 ml/min ; éluant : 0,1 M NaNO<sub>3</sub> ; détection : indice de réfraction. La masse en kDa des pics est estimée grâce aux standards de dextran utilisés et l'extrapolation des courbes de régression sur les différentes colonnes chromatographiques utilisées en fonction de leur masse de référence et leur temps d'élution. Le chromatogramme modifié ici est donc présenté en fonction de la masse en kDa et non en fonction du temps.

Après 1 h à 35°C, la dépolymérisation des ulvanes a débuté et aboutit à des fractions majoritairement composées de hauts PM (DEP-H1, Figure 77), entre 2000 et 3000 kDa (Tableau XIII).

La poursuite du procédé pendant 2 h à 50°C (DEP-H3, Figure 77) entraîne une dépolymérisation encore plus importante des ulvanes puisque le PM est réduit d'un facteur 1,1 à 1,8 en comparaison avec la condition précédente (1 h à 35°C).

En continuant le procédé pendant 4 h à 50°C (DEP-H7-1, Figure 77), l' $I_p$  mesuré au niveau des fractions est relativement élevé : 3,2 à 4,0 (Tableau XIII), ce qui indique un profil de tailles non homogène avec un mélange de poids moléculaires. De façon similaire, la dépolymérisation pendant 7 h à 50°C (DEP-H7-2, Figure 77) aboutit à des fractions de haute dispersité ( $I_p = 5,5$ ) constituées de PM relativement bas (4 à 40 kDa).

Après 24 h de dépolymérisation à 50°C (DEP-H24/DEP-HD, Figure 77) les fractions se caractérisent par un faible indice de polydispersité (1,2 à 1,3) avec une majorité de faibles PM (Tableau XIII).

**Tableau XIII : Caractérisation par HPSEC des poids moléculaires moyens des ulvanes purifiés par précipitation éthanolique et dépolymérisés par hydrolyse radicalaire ou acide**

Fractions		M <sub>n</sub> (kDa)		M <sub>w</sub> (kDa)		I <sub>p</sub>		DP	
		M	E	M	E	M	E	M	E
Ulvanes purifiés par précipitation éthanolique	PP-U*	1691	1651	3171	2290	1,9	1,4	9845	9665
	DEP-H1*	1743	1480	3045	2154	1,8	1,5	10048	8673
	DEP-H3*	975	1343	2241	1943	2,3	1,5	5620	7866
Ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	DEP-H7-1	34,9	128	111	510	3,2	4,0	202	749
	DEP-H7-2	37,1	-	204	-	5,5	-	217	-
	DEP-H24	2,1	-	2,6	-	1,2	-	12	-
	DEP-HD	3,8	7,0	2,6	8,7	1,3	1,2	22	41
	DEP-AD	1,5	1,5	1,6	1,6	1,1	1,1	9	9

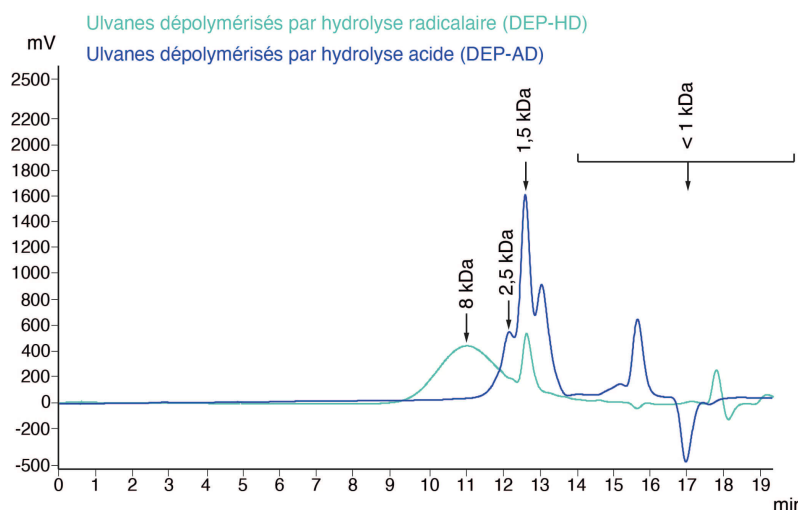
M : Macération ; E : EAE ; - : Fraction non produite ; M<sub>n</sub> : Masse moléculaire moyenne en nombre ; M<sub>w</sub> : Masse moléculaire moyenne en masse ; I<sub>p</sub> : Indice de polydispersité ; DP : Degré de Polymérisation.

\* Les données pour PP-U, DEP-H1 et DEP-H3 se trouvent en limite de gamme des standards de dextrans.

Le Tableau XIII indique également que plus le temps et la température de dépolymérisation par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmentent, plus le Degré de Polymérisation (DP) des fractions diminue. En effet, le DP des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire atteint finalement 22 et 41 respectivement pour ceux issus de macération et EAE après 24 h à 50°C. Finalement, la dépolymérisation augmente avec l'augmentation du temps et de la température. L'optimisation de la dépolymérisation par hydrolyse radicalaire est donc effectuée après 24 h à 50°C et aboutit à la production de fractions d'ulvanes dépolymérisés de bas poids moléculaires (DEP-HD PP-UM : M<sub>n</sub> = 3,8 kDa et M<sub>w</sub> = 2,6 kDa ; DEP-HD PP-UE : M<sub>n</sub> = 7,0 kDa ; et M<sub>w</sub> = 8,7 kDa) avec un faible I<sub>p</sub> de 1,2 à 1,3.

La dépolymérisation par hydrolyse acide des ulvanes en utilisant la résine Amberlite est réalisée selon le protocole optimal (24 h à 80°C) déterminé par Adrien *et al.* (2017b). Ce procédé de dépolymérisation par hydrolyse acide aboutit à la production d'ulvanes dépolymérisés de bas PM de 1,5 kDa (M<sub>n</sub> = 1,5 ± 0,1 kDa et M<sub>w</sub> = 1,6 ± 0,1 kDa, *n*=3) avec un faible I<sub>p</sub> de 1,1, indiquant une homogénéité des profils de taille des fractions (Tableau XIII et Figure 78). Par ailleurs, le degré de polymérisation des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide est faible (DP = 9, Tableau XIII) et la chaîne saccharidique de la fraction a donc été réduite à environ 9 motifs.

La comparaison des deux procédés de dépolymérisation met en évidence l'efficacité de l'hydrolyse acide sur résine échangeuse d'ions pour l'obtention d'ulvanes de plus bas poids moléculaires.



**Figure 78 : Chromatogramme HPSEC des ulvanes dépolymérisés par hydrolyses radicalaire et acide**  
Colonne utilisée : G3000PW<sub>XL</sub> ; Débit d'élution : 0,7 ml/min ; Éluant : 0,1 M NaNO<sub>3</sub> ; Détection : indice de réfraction.

La Figure 78 montre en effet que le procédé de dépolymérisation par hydrolyse acide aboutit à des fractions de plus bas PM (1,5 kDa) que le procédé d'hydrolyse radicalaire (7 kDa).

Le Tableau XIII met également en évidence des différences de poids moléculaires entre les fractions dépolymérisées par hydrolyse radicalaire issues de macération et celles issues d'EAE. Par ailleurs, aucune différence n'est observée entre les fractions dépolymérisées par hydrolyse acide issues de macération et celles issues d'EAE.

Finalement, les deux procédés de dépolymérisation appliqués aux ulvanes purifiés par précipitation éthanolique sont efficaces pour la production de fractions de bas poids moléculaires (oligo-ulvanes) inférieurs à 10 kDa.

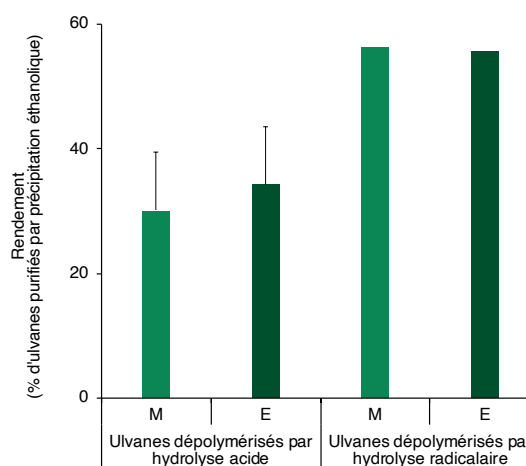
## 2. Rendements de production des fractions d'oligo-ulvanes

Les rendements de production des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire et par hydrolyse acide (oligo-ulvanes) sont présentés sur la Figure 79, et sont exprimés en pourcentage de recouvrement d'ulvanes purifiés par précipitation éthanolique.

Seule la dépolymérisation par hydrolyse acide a été réalisée en triplicat.

Les rendements de production d'ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire (55 à 56%) sont supérieurs à ceux d'hydrolyse acide ( $30 \pm 9,3\%$  et  $34 \pm 9,2\%$ ).

Aucune différence significative entre les rendements d'ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide issus de macération et d'EAE n'est observée.



**Figure 79 : Rendements de production des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide ( $n=3$ ) et radicalaire ( $n=1$ ), issus de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E)**

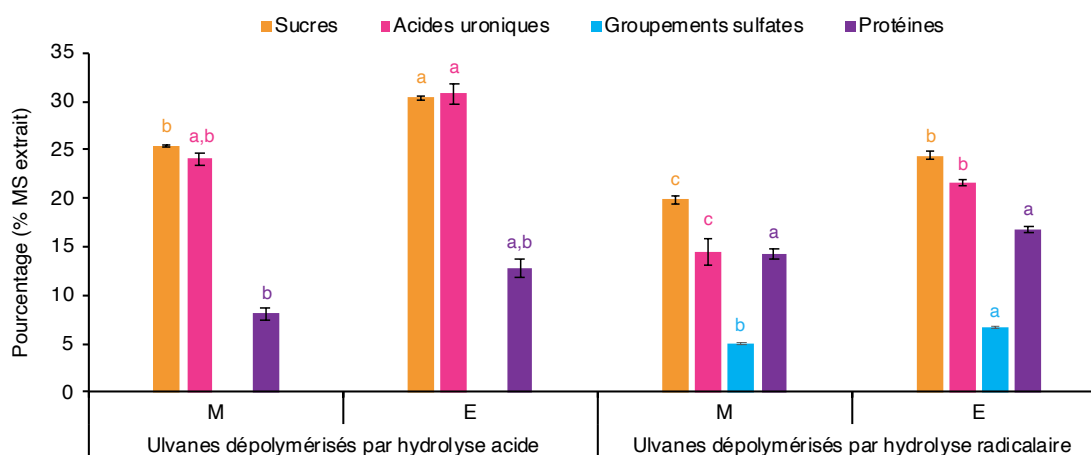
La significativité entre rendement issu de macération et d'EAE est testée pour les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide à l'aide d'un test *t* de Student.

### 3. Caractérisation biochimique et monosaccharidique des fractions d'oligo-ulvanes

#### a) Composition biochimique des fractions d'oligo-ulvanes

La Figure 80 présente la composition biochimique des fractions d'oligo-ulvanes (ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide et hydrolyse radicalaire) en sucres, acides uroniques, groupements sulfates et protéines. La composition biochimique est exprimée en pourcentage de matière sèche de l'échantillon analysé (% MS extrait).

Les fractions d'oligo-ulvanes sont riches en sucres (19,9 à 30,4% ± 0,2 à 0,4%) et acides uroniques (14,5 à 30,8% ± 0,4 à 1,4%). Aussi, les ulvanes issus de dépolymérisation par hydrolyse acide présentent des teneurs significativement plus élevées en sucres (+6,0%) et acides uroniques (+9,2%) que les fractions d'ulvanes issues de dépolymérisation par hydrolyse radicalaire.



**Figure 80 : Composition biochimique (% MS extrait) des ulvanes dépolymérisés issus de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E)**

Les valeurs sont les moyennes ± erreurs standards ( $n=3$ ). Les lettres en considérant une série (sucres, acides uroniques, groupements sulfates ou protéines), lorsque différentes, représentent les différences significatives selon le test de Tukey par paires *a posteriori* d'une ANOVA, en considérant  $p < 0,05$ .

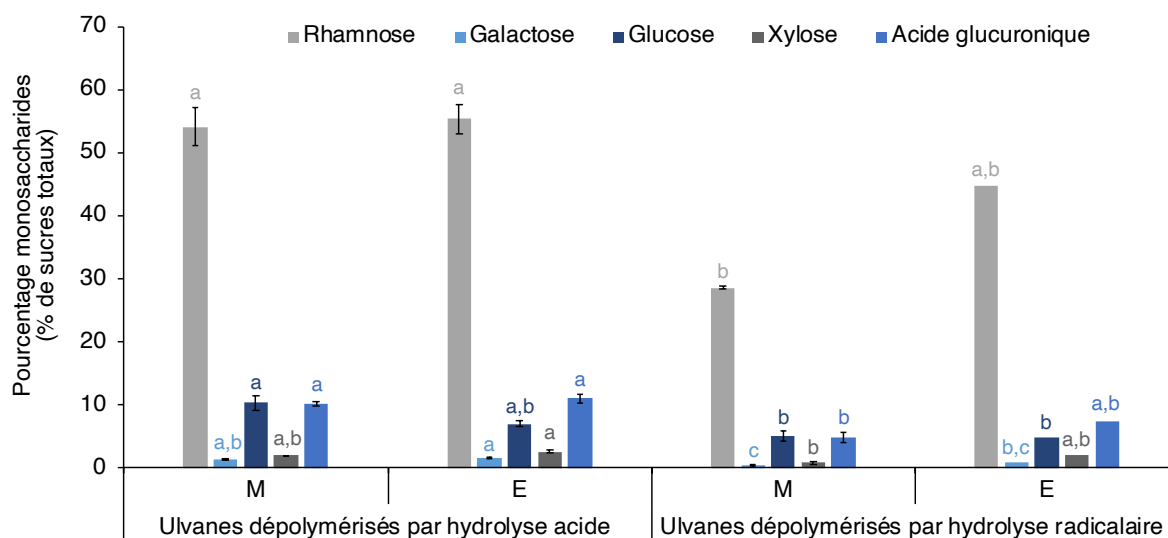
Le procédé de dépolymérisation par hydrolyse acide sur résine Amberlite aboutit à la perte de groupements sulfates liés aux polysaccharides. En effet, avec la méthode de l'Azure A, aucun groupement sulfate n'est détecté dans ces fractions. Le procédé de dépolymérisation par hydrolyse radicalaire par  $H_2O_2$  a entraîné un clivage partiel des groupements sulfates liés aux polysaccharides puisqu'ils représentent 6,6% au maximum. La teneur en protéines des fractions est comprise entre 8,1% et 16,8%. Les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire sont plus riches en protéines (DEP-HD PP-UM : 14,2 ± 0,5% et DEP-HD PP-UE : 16,8 ± 0,4%) que ceux issus d'hydrolyse acide (DEP-AD PP-UM : 8,1 ± 0,6% et DEP-AD PP-UE : 12,8 ± 1,0%).

L'emploi de l'EAE en comparaison avec la macération permet un enrichissement des fractions d'oligo-ulvanes, en sucres de 5% (significatif,  $p < 0,05$ ), en acides uroniques de 7% (significatif,  $p < 0,05$ , uniquement pour les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire) et en protéines de 3 à 5% (non significatif).

## b) Composition monosaccharidique des fractions d'oligo-ulvanes

La Figure 81 indique la composition en monosaccharides des fractions d'oligo-ulvanes. Cette composition est exprimée en pourcentage de sucres totaux des échantillons analysés (g/100 g de sucres totaux). Le fructose, glucosamine, ribose, mannose et arabinose sont faiblement présents (< 1%) voire non détectés dans les échantillons analysés (données non montrées).

Le rhamnose (28,6 à 55,4%), l'acide glucuronique (4,8 à 11,0%) et le glucose (4,9 à 10,3%) sont les monosaccharides les plus représentatifs des fractions d'oligo-ulvanes. Pour les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide, le rhamnose représente plus de la moitié du contenu en sucres.



**Figure 81 : Composition en monosaccharides (% de sucres totaux) des ulvanes dépolymérisés issus de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E)**

Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards ( $n=3$  pour les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide et  $n=2$  pour les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire issus de macération et  $n=1$  pour les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire issus d'EAE). Les lettres en considérant une série (rhamnose, galactose, glucose, xylose ou acide glucuronique), lorsque différentes, représentent les différences significatives selon le test de Tukey par paires *a posteriori* d'une ANOVA, en considérant  $p < 0,05$ .

Les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide présentent des teneurs en rhamnose et en acide glucuronique plus élevées que ceux issus d'hydrolyse radicalaire (significatif  $p < 0,05$  pour ceux issus de macération).

Comme pour les ulvanes bruts et purifiés, de faibles teneurs en xylose (0,8 à 2,6%) et galactose (0,4 à 1,7%) sont détectés dans les fractions d'oligo-ulvanes.

Aucune différence significative en termes de composition monosaccharidique entre les fractions d'oligo-ulvanes issues de macération ou d'EAE n'est observée.

## 4. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les expériences de MALDI-TOF ont été réalisées sur les fractions d'oligo-ulvanes de plus bas poids moléculaires, c'est-à-dire sur les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide. Les données ont été obtenues en mode d'ionisation positif ( $M-H^+$ ).

Le spectre de masse du standard de dextran (1 kDa) est présenté sur la Figure 82. La formation d'adduit de sodium (Na) sur le dextran est mise en évidence sur le spectre de masse, et l'adduit sodium est observé pour toutes les populations de l'échantillon (Čmelík *et al.*, 2004). L'oligosaccharide correspondant à  $m/z = 851$  est composé de 5 unités de glucose ( $C_6H_{12}O_6$ , 180,06 g/mol, Glc). La valeur de  $m/z$  observée peut se retrouver grâce au calcul détaillé :

$m/z = 5 \cdot \text{Masse (Glc)} - 4 \cdot \text{Masse (H}_2\text{O)} \text{ dû à la formation des liaisons glycosidiques} + \text{Masse (Na)} - \text{Masse (H)} \text{ dû à la liaison de Na au Glc} + \text{Masse (H}^+) \text{ dû à (M-H}^+)$ , soit  $851 = 5 \cdot 180 - 4 \cdot 18 + 23 - 1 + 1$ .

Le standard de dextran contient 9 populations d'oligosaccharides différents comportant entre 4 et 12 unités de glucose.

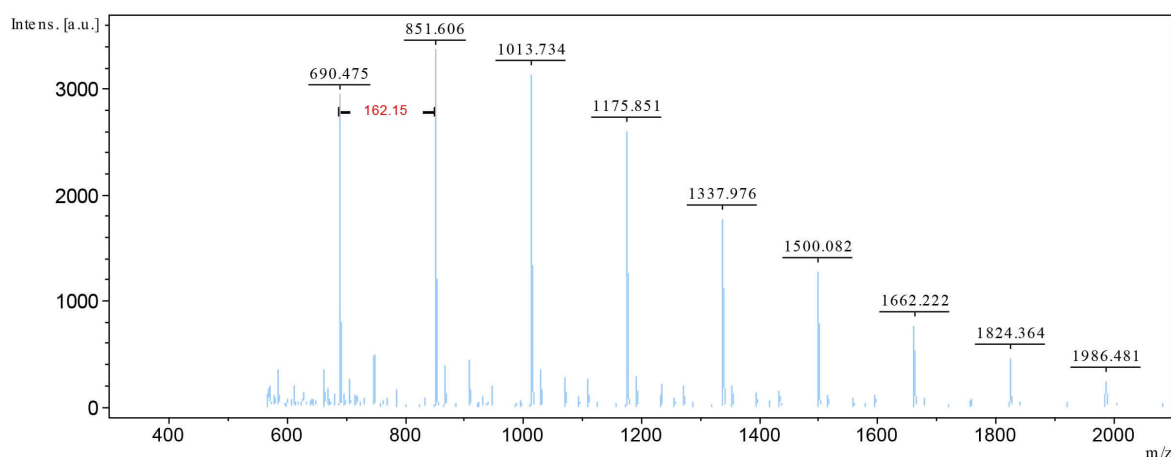


Figure 82 : Spectre de masse MALDI-TOF du standard de dextran 1 kDa

Le spectre de masse des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide, issus d'EAE, est présenté sur la Figure 83. Ce spectre de masse révèle la présence de différents oligosaccharides. La composition en oligosaccharides est déduite de la somme de masses molaires de monosaccharides comme le glucose (Glc), le xylose ( $C_5H_{10}O_5$ , 150,05 g/mol, Xyl), le rhamnose ( $C_6H_{12}O_5$ , 164,07 g/mol, Rha) ou l'acide glucuronique ( $C_6H_{10}O_7$ , 194,04 g/mol, GlcA) pouvant être ou non sulfatés ( $HNaSO_4$ , 120,04 g/mol).

Sur la base de leur poids moléculaire, les ions pseudomoléculaires suivants pourraient être attribués du fait de la correspondance de la somme de leurs masses molaires et de l'élimination de molécules d'eau dans la formation de liaisons (liaison glycosidique et liaison sulfate) :

- $m/z$  à 839 pour un Glc-Xyl-Rha-GlcA disulfaté,
- $m/z$  à 809 pour un Glc-Xyl-(Rha)<sub>2</sub> disulfaté,
- $m/z$  à 737 pour un Glc-Xyl-Rha-GlcA monosulfaté,
- $m/z$  à 663 pour un Glc-Xyl-Rha disulfaté,
- $m/z$  à 647 pour un Xyl-(Rha)<sub>2</sub> disulfaté,
- $m/z$  à 619 pour un Xyl-(Rha)<sub>2</sub>-GlcA.

Par exemple, l'oligosaccharide à  $m/z = 663$  a été identifié par l'équation suivante :

$m/z = \text{Masse (Glc)} + \text{Masse (Xyl)} + \text{Masse (Rha)} - 2 \cdot \text{Masse (H}_2\text{O)} \text{ dû à la formation de 2 liaisons glycosidiques} + 2 \cdot \text{Masse (HNaSO}_4) - 2 \cdot \text{Masse (H}_2\text{O)} \text{ dû à la liaison de deux sulfates sur des unités saccharidiques} + \text{Masse (H}^+) \text{ dû à (M-H}^+)$  soit  $663 = 180 + 150 + 164 - 2 \cdot 18 + 2 \cdot 120 - 2 \cdot 18 + 1$ .

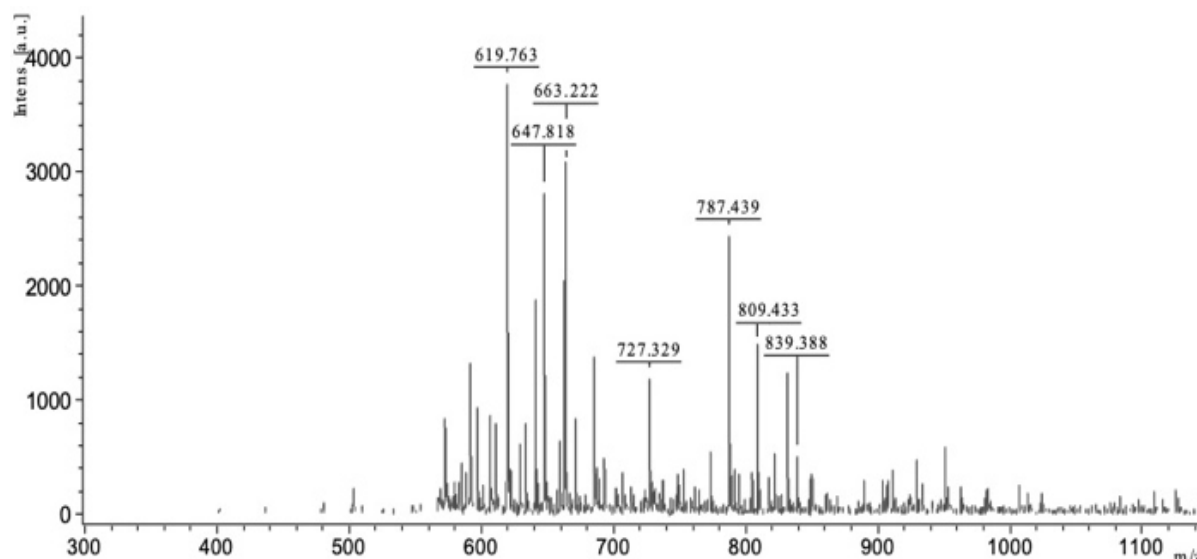


Figure 83 : Exemple de spectre de masse MALDI-TOF d'ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide issues d'*Ulva* sp. par EAE

Ces résultats de MALDI-TOF confirment les résultats obtenus par HPAEC-PAD concernant l'analyse des monosaccharides. La composition caractéristique des ulvanes est retrouvée au sein de la fraction via la richesse en rhamnose, xylose et acide uronique, sulfatés ou non.

### C. Évaluation d'activités biologiques des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes par des tests biochimiques

---

#### 1. Évaluation de la capacité de piégeage des radicaux libres : activité antiradicalaire

Le stress oxydatif est un des mécanismes majeurs impliqué dans le vieillissement cutané. Le stress oxydatif induit se traduit donc par une production excessive de ROS (espèces réactives de l'oxygène), dont les radicaux libres, qui attaquent ensuite les acides aminés, les protéines et les AGPI présents au niveau cellulaire. L'activité antiradicalaire permet ainsi de lutter contre ces ROS soit en les neutralisant soit en favorisant leur décomposition.

L'évaluation de l'activité antiradicalaire des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, issues de macération et d'EAE, a été réalisée par le test chimique de capture des radicaux libres DPPH<sup>\*</sup>. L'acide ascorbique utilisé ici comme contrôle positif (inhibiteur radicalaire) présente une activité inhibitrice avec une concentration inhibitrice médiane Cl<sub>50</sub> de 6,6 µg/ml. Néanmoins, les fractions testées (ulvanes bruts, purifiés et dépolymérisés) aux concentrations finales de 50, 100, 250, 500 et 1000 µg/ml, ne présentent aucune activité d'inhibition dans les conditions expérimentales.

#### 2. Évaluation de la capacité d'inhibition de l'élastase : activité anti-vieillessement

L'élastase est une protéase impliquée dans la dégradation de l'élastine, une protéine hydrophobe, structurale et fonctionnelle, importante au niveau de la peau et notamment de la MEC.

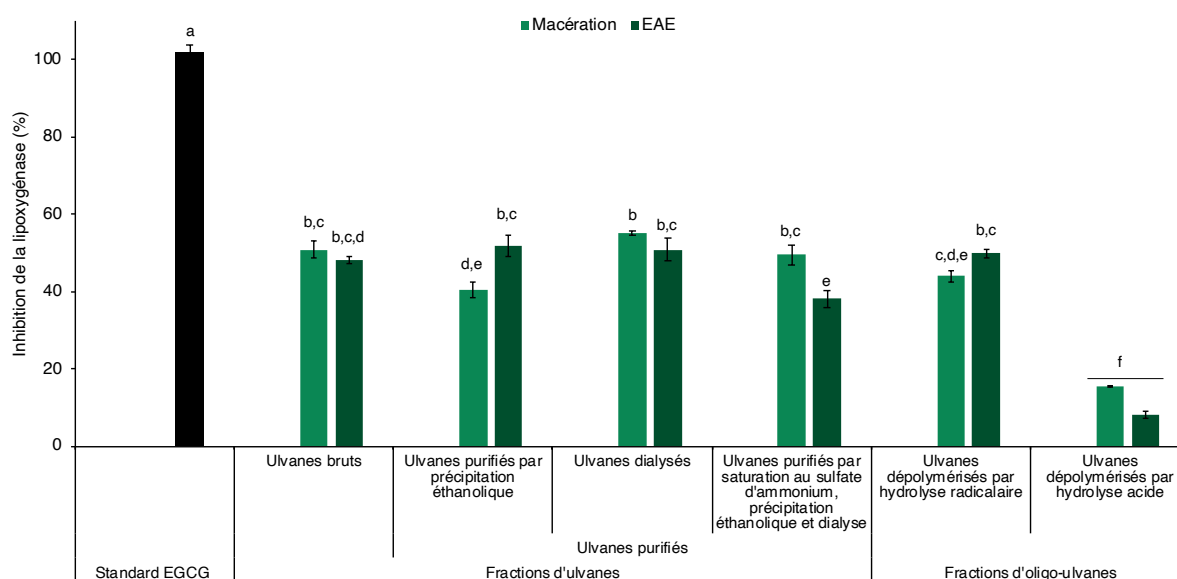
La dégradation de l'élastine par l'élastase et d'autres MMP aboutit à la perte de fermeté et d'élasticité de la peau, caractéristique du vieillissement cutané.

Les activités des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, issues de macération et d'EAE, sur la capacité d'inhibition de l'élastase ont été évaluées par un test d'inhibition enzymatique. L'ovomucoïde utilisé ici comme contrôle positif, présente une activité inhibitrice de  $90,2 \pm 0,0\%$  à la concentration de  $500 \mu\text{g/ml}$ . Néanmoins, les fractions testées (ulvanes bruts, purifiés et dépolymérisés) à une concentration finale de  $500 \mu\text{g/ml}$ , ne montrent aucune activité d'inhibition de l'élastase dans les conditions expérimentales.

### 3. Évaluation de la capacité d'inhibition de la lipoxygénase : activité anti-inflammatoire

Les lipoxygénases sont des enzymes impliquées dans des processus inflammatoires *via* la synthèse de leucotriènes et participent à la sécrétion de ROS. Ainsi, le stress oxydatif, incluant la production de ROS, est connu pour jouer un rôle majeur dans le vieillissement cutané *via* la diminution de la synthèse de collagène par les fibroblastes et l'augmentation de la synthèse de MMP. Le potentiel anti-inflammatoire des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, issues de l'algue *Ulva* sp. par macération et EAE, a été estimé par le test d'inhibition de la lipoxygénase (LOX).

Les résultats obtenus pour les fractions testées (ulvanes bruts, purifiés et dépolymérisés) à une concentration finale de  $500 \mu\text{g/ml}$  sont présentés sur la Figure 84.



**Figure 84 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération ou EAE sur l'inhibition de la lipoxygénase**

EGCG (EpiGalloCatéchine Gallate) à  $250 \mu\text{g/ml}$  est utilisée comme standard. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards ( $n=3$ ). Les lettres, lorsque différentes, représentent les différences significatives selon le test de Tukey par paires *a posteriori* d'une ANOVA, en considérant  $p < 0,05$ .

Le standard EGCG à une concentration de  $250 \mu\text{g/ml}$  est efficace pour inhiber la LOX à 100% sur la cinétique de 10 min réalisée. À la concentration testée de  $500 \mu\text{g/ml}$ , l'ensemble des fractions testées sont significativement moins actives que le standard ( $p < 0,05$ ).



Toutefois, l'inhibition de la LOX par les fractions varie de 40 à 55% pour les ulvanes bruts, purifiés et dépolymérisés par hydrolyse radicalaire. Une inhibition de la LOX significativement plus faible ( $p < 0,05$ ) par les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide est observée (8% d'inhibition pour DEP-AD PP-UE et 16% d'inhibition pour DEP-AD PP-UM). Cette perte d'activité biologique pourrait être liée à la perte quasi-totale des groupements sulfates des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide.

Des différences significatives d'activités d'inhibition de la LOX ( $p < 0,05$ ) entre les fractions issues de macération et d'EAE sont observées seulement pour les ulvanes purifiés par précipitation éthanolique ( $\%_{\text{inhibition LOX M}} < \%_{\text{inhibition LOX E}}$ ) et celles purifiés par saturation au sulfate d'ammonium ( $\%_{\text{inhibition LOX M}} > \%_{\text{inhibition LOX E}}$ ). Une similitude des résultats d'activité est observée pour les autres fractions d'ulvanes issues de macération et d'EAE.

Les résultats du test de la LOX ne sont pas suffisamment discriminants pour la sélection de fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes mais permettent de confirmer une première activité biologique anti-inflammatoire de celles-ci.

### III. Conclusions

Dans ce chapitre, des fractions riches en ulvanes ont été produites à partir de l'algue verte *Ulva* sp. *via* l'utilisation de l'EAE, en comparaison de la macération. Ces fractions d'ulvanes ont ensuite été purifiées *via* différents procédés : la précipitation éthanolique, la dialyse, et la saturation au sulfate d'ammonium suivie d'une précipitation éthanolique et d'une dialyse. Aussi, la dépolymérisation des ulvanes purifiés par précipitation éthanolique (PP-UM et PP-UE) a été étudiée par comparaison de deux procédés : l'hydrolyse radicalaire par utilisation du peroxyde d'hydrogène et l'hydrolyse acide par utilisation d'une résine échangeuse d'ions.

Les résultats obtenus en termes de rendements et de compositions biochimiques des fractions issues de macération et d'EAE ont été comparés. Les résultats ont montré que l'EAE permet de meilleurs rendements d'extraction et de recouvrement des ulvanes que la macération. En termes de composition, les fractions brutes et purifiées produites après EAE présentent une teneur plus élevée en sucres (notamment en rhamnose), acides uroniques et groupements sulfates, c'est-à-dire en ulvanes, que celles produites après macération.

Il a également été mis en évidence que les procédés de purification employés ont permis un enrichissement différent en ulvanes, démontré *via* l'analyse de la composition biochimique et monosaccharidique des fractions. Le procédé de dialyse est particulièrement efficace.

Par l'étude de la distribution de poids moléculaires, il a été montré que les deux procédés de dépolymérisation étudiés aboutissent à la production de fractions de bas poids moléculaires (de 1,5 à 7 kDa).

Ainsi, les ulvanes bruts et purifiés sont des fractions dites riches en polysaccharides de hauts poids moléculaires (fractions d'ulvanes) en opposition aux ulvanes dépolymérisés qui sont riches en poly-/oligosaccharides de bas poids moléculaires (fractions d'oligo-ulvanes). Par ailleurs, l'analyse de la composition biochimique a mis en évidence que la dépolymérisation par hydrolyse acide aboutit à une fraction de bas poids moléculaire, relativement différente des autres du fait de la perte quasi-totale en groupements sulfates.

En termes d'activités biologiques, ces premiers travaux montrent que les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes présentent une activité anti-inflammatoire *via* l'inhibition de la lipoxigénase. Ce premier résultat d'activité biologique met en évidence une potentielle relation/structure fonction des ulvanes. En effet, la fraction d'ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide présentant une activité anti-inflammatoire fortement diminuée pourrait être corrélée à la perte de groupements sulfates lors du procédé de dépolymérisation et au poids moléculaire de celle-ci. Néanmoins, ces résultats ne permettent pas de discriminer les différentes fractions d'ulvanes (bruts et purifiés) en termes d'activité biologiques.

L'inhibition de la lipoxigénase par les fractions d'ulvanes pourrait donc indirectement réduire la sécrétion de ROS et ainsi réduire leur rôle majeur dans le vieillissement cutané *via* la modulation de synthèse de collagène et de MMP par les fibroblastes.

Ainsi, les effets des ulvanes bruts et purifiés (fractions d'ulvanes) et des ulvanes dépolymérisés (fractions d'oligo-ulvanes) issus de l'algue *Ulva* sp. après macération ou EAE sur le métabolisme matriciel de fibroblastes dermiques humains seront ensuite étudiés dans le chapitre 4 suivant.

Une partie des résultats obtenus dans ce chapitre 3 ont fait l'objet d'un article intitulé « Production of Active Poly- and Oligosaccharidic Fractions from *Ulva* sp. by Combining Enzyme-Assisted Extraction (EAE) and Depolymerization » publié dans le journal *Metabolites* (IF 3,303) en 2019 (Fournière *et al.*, 2019). Par ailleurs, le Tableau XIV récapitule les pourcentages de recouvrement en polysaccharides *via* les trois procédés de purification employés, mais également les compositions biochimiques, monosaccharidiques et de distribution des poids moléculaires des différentes fractions produites à partir d'*Ulva* sp. à l'issue du procédé de macération ou d'EAE, ainsi que le résultat d'activité anti-inflammatoire.

En conclusion, cette partie permet de mettre en évidence qu'en termes de procédé d'extraction aqueux, l'ensemble des résultats propose l'EAE comme un procédé particulièrement intéressant pour la production d'ulvanes, notamment si celui-ci est suivi de procédés de purification efficaces. L'obtention de fractions d'oligo-ulvanes (ulvanes de bas poids moléculaires), par l'utilisation de deux procédés de dépolymérisation distincts, a été réalisée. L'étude montre également la présence d'activité biologique anti-inflammatoire des fractions d'ulvanes polysaccharidiques (ulvanes bruts et purifiés) et oligosaccharidiques (oligo-ulvanes : ulvanes dépolymérisés) issues de l'algue proliférative *Ulva* sp.. Enfin, d'un point de vue fondamental, cette partie montre que l'activité biologique pourrait varier en fonction du degré de sulfatation et du poids moléculaire de la fraction considérée.

Chapitre 3 : Extraction, purification et dépolymérisation d'ulvanes de la macroalgue *Ulva* sp. et tests d'activités biologiques

Tableau XIV : Rappel des taux de recouvrements de polysaccharides, des compositions biochimiques et monosaccharidiques, des poids moléculaires des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), et résultats d'activité anti-inflammatoire

	Fractions polysaccharidiques : Fractions d'ulvanes								Fractions oligosaccharidiques : Fractions d'oligo-ulvanes				
	Ulvanes bruts		Ulvanes purifiés par précipitation éthanolique		Ulvanes dialysés		Ulvanes purifiés par saturation au sulfate d'ammonium		Ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire		Ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide		
	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	
<b>Recouvrement polysaccharides (% MS extrait brut)</b>			70,6 ± 4,8	69,5 ± 6,1	88,6 ± 7,9	84,7 ± 9,1	30,0	51,9					
<b>Composition (% MS extrait)</b>	Matière minérale	38,0 ± 0,2	35,2 ± 0,2	33,7 ± 0,7	26,8 ± 1,0	13,2 ± 0,8	13,4 ± 0,8	Non déterminé		Non déterminé		Non déterminé	
	Sucres	21,9 ± 0,1	23,5 ± 0,5	24,7 ± 0,3	30,7 ± 0,2	34,4 ± 0,6	37,4 ± 0,2	31,0 ± 0,6	35,1 ± 0,4	19,9 ± 0,4	24,4 ± 0,4	25,4 ± 0,2	30,4 ± 0,2
	Acides uroniques	21,2 ± 0,8	18,5 ± 0,6	20,8 ± 0,1	23,7 ± 0,7	28,3 ± 1,1	37,0 ± 0,7	29,0 ± 0,3	36,0 ± 0,8	14,5 ± 1,4	21,6 ± 0,4	24,1 ± 0,6	30,8 ± 1,0
	Sulfates	25,9 ± 0,4	29,9 ± 0,5	31,8 ± 0,2	41,9 ± 0,5	44,1 ± 0,1	49,1 ± 1,0	43,6 ± 0,6	49,4 ± 0,5	5,0 ± 0,1	6,6 ± 0,1	Non détecté	
	Protéines	9,0 ± 0,2	10,5 ± 0,4	9,4 ± 0,1	11,2 ± 0,2	14,3 ± 0,1	12,8 ± 0,2	14,4 ± 0,3	8,9 ± 0,5	14,2 ± 0,5	16,8 ± 0,4	8,1 ± 0,6	12,8 ± 1,0
<b>Monosaccharides (% sucres totaux)</b>	Rhamnose	44,4 ± 3,3	50,4 ± 6,0	38,8 ± 2,0	42,4 ± 0,3	47,4 ± 6,3	50,2 ± 2,2	59,4	59	28,6 ± 0,3	44,9	54,1 ± 3,0	55,4 ± 2,3
	Acide glucuronique	9,1 ± 1,2	10,6 ± 0,9	11,9 ± 2,0	11,6 ± 1,9	10,5 ± 0,3	11,9 ± 0,3	11,6	11,2	4,8 ± 0,8	7,5	10,2 ± 0,4	11,0 ± 0,7
	Glucose	10,2 ± 0,5	14,0 ± 1,2	7,6 ± 1,3	5,7 ± 0,7	7,6 ± 0,1	3,3 ± 0,2	5,9	4,0	5,0 ± 0,8	4,9	10,3 ± 1,1	7,0 ± 0,4
	Xylose	2,4 ± 0,4	3,2 ± 0,2	2,2 ± 0,3	2,7 ± 0,2	2,9 ± 0,3	2,8 ± 0,2	3,6	3,0	0,8 ± 0,3	2,1	2,0 ± 0,0	2,6 ± 0,2
<b>Poids moléculaire moyen en poids (kDa)</b>	Non déterminé		> 670		Non déterminé		Non déterminé		2,6	8,7	1,5	1,6	
<b>Inhibition de la lipoxigénase (%)</b>	50,8 ± 2,1	48,2 ± 0,9	40,4 ± 2,0	51,8 ± 2,8	55,0 ± 0,5	50,8 ± 3,0	49,5 ± 2,7	38,1 ± 2,1	44,0 ± 1,4	49,9 ± 1,1	15,6 ± 0,1	8,0 ± 0,9	

# **Chapitre 4**

**Effets des fractions d'ulvanes  
et d'oligo-ulvanes issues de la  
macroalgue *Ulva* sp. sur le  
métabolisme matriciel de  
fibroblastes dermiques  
humains en culture**



# Chapitre 4 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de la macroalgue *Ulva* sp. sur le métabolisme matriciel de fibroblastes dermiques humains en culture

## I. Introduction

Les résultats exposés au chapitre 3 ont mis en évidence que les fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et purifiés) et d'oligo-ulvanes (ulvanes dépolymérisés) présentaient des différences en termes de composition biochimique et de distribution de poids moléculaires, susceptibles d'induire des différences d'activités biologiques.

Des études antérieures ont permis de montrer que les polysaccharides algaux présentaient des activités biologiques sur des cellules du système cutané. Les travaux ont principalement porté sur les polysaccharides algaux issus des *Phaeophyceae* comme les galactofucanes (Rioux *et al.*, 2013), les fucanes (Senni *et al.*, 1998), les polysaccharides sulfatés riches en fucose (Senni *et al.*, 2006 ; Moon *et al.*, 2008, 2009 ; Hwang *et al.*, 2017) ou la laminarine (Ayoub *et al.*, 2015 ; Ozanne *et al.*, 2020). Ces études ont pu montrer que les polysaccharides issus de différentes algues brunes présentent des effets biologiques sur la viabilité et la prolifération des fibroblastes mais également sur la synthèse de composants de la MEC.

Toutefois, les travaux portant sur l'évaluation des activités biologiques de polysaccharides sulfatés de l'algue verte *Ulva* sp. sur des fibroblastes dermiques humains en culture, sont encore relativement peu nombreux (Ko *et al.*, 2013 ; Cai *et al.*, 2016 ; Adrien *et al.*, 2017b). À titre d'exemple, les travaux de Ko *et al.* (2013) ont montré que le traitement de fibroblastes dermiques humains par des ulvanes hydrolysés d'*Ulva pertusa* augmente la prolifération cellulaire des fibroblastes sénescents et pré-sénescents, et stimule l'expression de collagène de type I au niveau protéique et transcriptomique (Ko *et al.*, 2013). Récemment, Adrien *et al.* (2017b) ont pu mettre en évidence que les ulvanes de 57 kDa issus de l'algue *Ulva* sp. induisaient une réduction de la prolifération des fibroblastes tandis que des ulvanes dépolymérisés de 4 kDa n'avaient aucun effet. Aussi, il a été montré que ces deux fractions de poids moléculaires différents ne modifiaient pas la production de collagène mais augmentaient la production d'acide hyaluronique. Cette augmentation de la synthèse d'acide hyaluronique a été corrélée au poids moléculaire (Adrien *et al.*, 2017b). Ces différents travaux suggèrent que les ulvanes peuvent présenter différents effets sur le métabolisme des fibroblastes. Néanmoins, à l'heure actuelle, aucune étude n'a été menée sur les effets potentiels de fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. obtenues par Extraction Assistée par Enzyme (EAE) sur le métabolisme cellulaire de fibroblastes dermiques humains aux niveaux transcriptomique et protéomique.

Dans ce contexte, l'étude a porté sur les activités potentielles des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la synthèse, par les fibroblastes, des composants de la MEC du derme. Parmi ces composants, le collagène en est un des plus importants du fait de son abondance, et de son rôle indispensable dans l'intégrité structurelle du derme et dans le maintien de ses propriétés mécaniques. Dans le derme cutané, le collagène de type I est l'isotype majoritaire. Il est essentiel au développement des tissus et des organes et intervient également dans la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire et dans les processus de réparation tissulaire. Le collagène de type III, présente aussi un rôle prépondérant dans le processus de réparation tissulaire. L'homéostasie matricielle, c'est-à-dire, l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme matriciel, est régulée par la présence d'enzymes protéolytiques, les MMP, qui interviennent dans la voie catabolique afin de dégrader ces collagènes. Aussi, les MMP, sont elles-mêmes régulées par leurs inhibiteurs, les TIMP. Par ailleurs, les GlycosAminoGlycanes (GAG) sulfatés et non sulfatés sont d'autres constituants importants de la MEC jouant un rôle structural et intervenant dans l'adhésion et la migration cellulaire.

Ce chapitre de notre étude consiste donc à analyser les effets potentiels de fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp., par macération ou EAE, sur la viabilité et la prolifération de fibroblastes dermiques humains en culture et sur les voies anaboliques et cataboliques de la MEC.

Dans un premier temps, les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes ont été investigués sur la synthèse de collagène total. Ensuite, les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression de collagène de type I et III (au niveau transcriptomique et protéomique) ont été analysés. Les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la synthèse d'autres composants de la MEC comme les GAG sulfatés et non sulfatés ont aussi été étudiés. Dans un second temps, les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression de l'enzyme catabolique MMP-1 et de son inhibiteur respectif, le TIMP-1, ont également été évalués au niveau transcriptomique et protéomique. Enfin, afin d'étudier de façon préliminaire le(s) mécanisme(s) mis en jeu au niveau cellulaire par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, les voies de signalisation de NF- $\kappa$ B et du TGF- $\beta$ 1 ont été étudiées au niveau transcriptomique. NF- $\kappa$ B, facteur *trans* pro-inflammatoire, intervient dans la synthèse des MMP mais également comme inhibiteur de la synthèse de collagène de type I. Pour cela, il opère principalement *via* sa sous-unité p65 notamment sur la liaison de Sp1 et Sp3 (« Specific protein » 1 et 3) en amont du promoteur du gène *COL1A1* (Rippe *et al.*, 1999 ; Beauchef *et al.*, 2012 ; Bigot *et al.*, 2012). Ainsi, une étude préliminaire du niveau moyen d'expression des ARNm de sa sous-unité p65 a été réalisée. Parmi les TGF- $\beta$ , le TGF- $\beta$ 1 est l'une des cytokines pro-fibrosantes les plus connues pour l'induction de la synthèse de collagène de type I. Pour cela, il met notamment en jeu les sites de liaison pour Sp1 et Sp3 ou *via* CBF (facteurs transcriptionnels) qui se fixent en amont promoteur du gène *COL1A1* (Jimenez *et al.*, 1994 ; Chen *et al.*, 1998 ; Lindahl *et al.*, 2002). Après liaison du TGF- $\beta$ 1 à ses récepteurs transmembranaires, les SMAD2/3 sont phosphorylés et interagissent avec SMAD4 (co-SMAD). Ils sont ainsi impliqués dans cette voie de signalisation, et se fixent en amont du promoteur de *COL1A1* (Chen *et al.*, 1999). Ainsi, l'étude préliminaire a porté sur l'analyse au niveau transcriptomique des niveaux moyens d'expression des ARNm de TGF- $\beta$ 1 et de SMAD2/3 et 4.

Ce travail a permis de répondre à différentes questions :

- Quelles sont les concentrations de fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes susceptibles d'influencer l'activité cellulaire des fibroblastes en culture et après quel temps d'incubation ?
- Les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes présentent-elles des effets différents en fonction du procédé d'extraction (macération ou EAE) et de production (purification ou dépolymérisation) ?
- Les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes modulent-elles le métabolisme matriciel des fibroblastes ? Une voie métabolique est-elle préférentiellement régulée ?
- Les résultats d'activités sur le métabolisme matriciel des fibroblastes permettent-ils de mettre en évidence une relation structure/fonction des ulvanes ?

## II. Résultats

### A. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur les activités cellulaires des fibroblastes en culture

---

Dans un premier temps, l'effet des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération ou EAE a été étudié sur les activités cellulaires de fibroblastes dermiques en culture.

Les incubations de fibroblastes ont été réalisées à 80% de confluence, dans un milieu à 2% de SVF avec 50, 100, 250, 500 et 1000 µg/ml de chaque fraction (ulvanes bruts, purifiés et dépolymérisés) pendant 24 h et 48 h pour l'évaluation de la prolifération cellulaire et de la cytotoxicité.

Ces évaluations ont été réalisées *via* le test WST-1 afin d'étudier l'impact sur l'activité de prolifération des fibroblastes, et *via* le dosage de la LDH, marqueur de cytotoxicité, afin d'étudier l'effet sur la mortalité cellulaire.

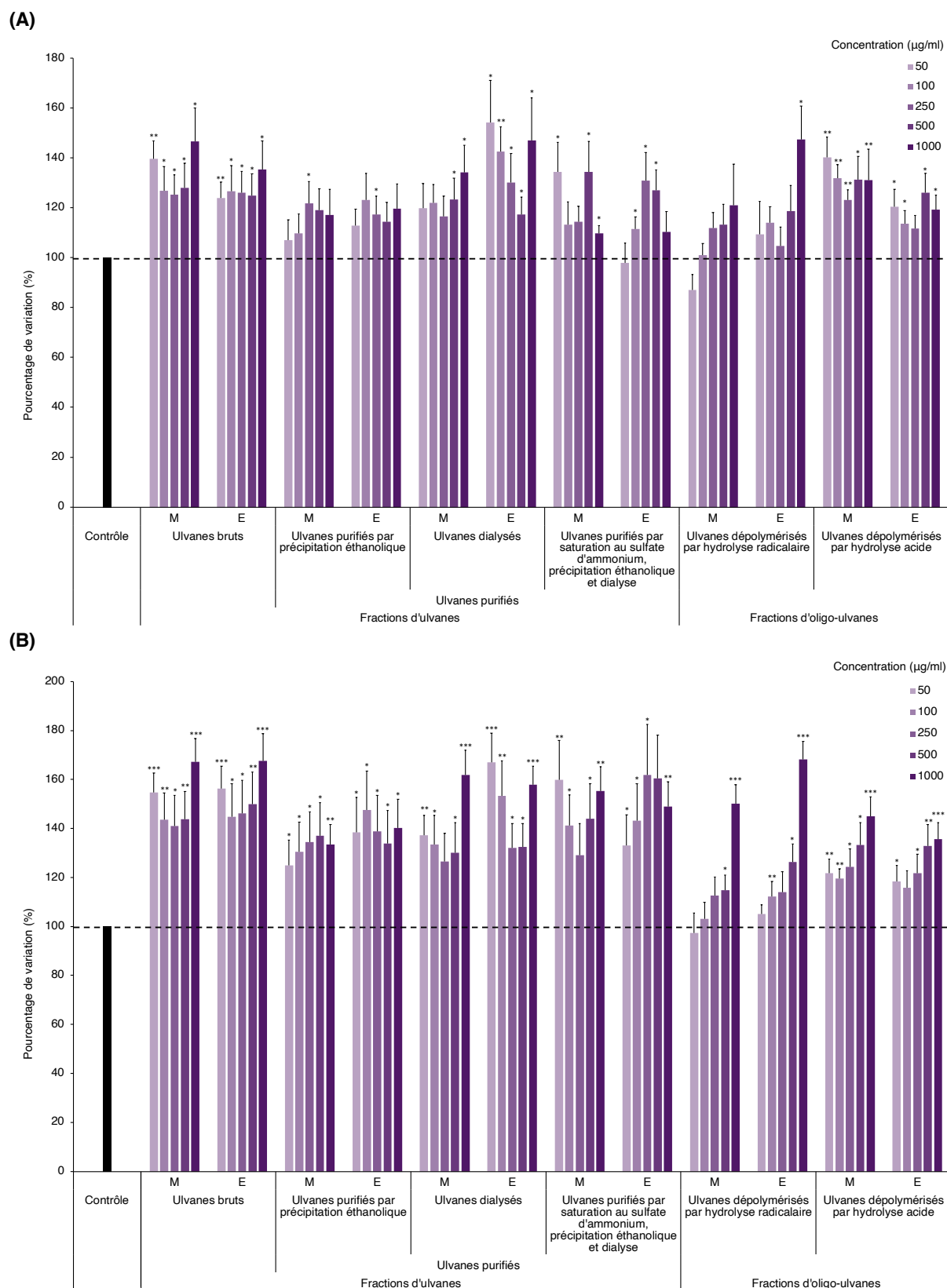
#### 1. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la prolifération des fibroblastes

Des fibroblastes issus du derme de six sujets sont incubés en présence des fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et purifiés) et d'oligo-ulvanes (ulvanes dépolymérisés) issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E). La Figure 85 représente les résultats obtenus concernant la prolifération des fibroblastes aux différents temps d'incubation de (A) 24 h et (B) 48 h en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes aux concentrations de 50, 100, 250, 500 et 1000 µg/ml.

Tout d'abord, une similarité des résultats concernant la prolifération des fibroblastes est observée en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes obtenues par macération et EAE quelle que soit la concentration étudiée et le temps d'incubation. Ceci est particulièrement observable en présence des ulvanes bruts, des ulvanes purifiés par précipitation éthanolique et des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide et radicalaire.

De manière générale, la prolifération des fibroblastes après 48 h d'incubation en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes est majoritairement plus élevée qu'après 24 h d'incubation.





**Figure 85 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E) sur la prolifération de fibroblastes dermiques humains en culture, aux concentrations de 50, 100, 250, 500 et 1000 µg/ml après (A) 24 h et (B) 48 h d'incubation, évalués par le test WST-1**

Les valeurs sont les moyennes ± erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données (\* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ ),  $n=6$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 30, 32, 35, 36, 43 et 45 ans).

En effet, la prolifération des fibroblastes en présence des fractions atteint au maximum +54,1% après 24 h d'incubation (Figure 85A) et +68,2% après 48 h d'incubation (Figure 85B).

De plus, une augmentation significative de la prolifération des fibroblastes est mise en évidence en présence de toutes les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à la concentration de 1000 µg/ml et après 48 h d'incubation (Figure 85B). L'augmentation significative ( $p < 0,001$ ) maximale de la prolifération des fibroblastes se fait après 48 h d'incubation (+68,2%, Figure 85B) en présence des ulvanes bruts (obtenus par macération et EAE) et des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire obtenus par EAE à la concentration de 1000 µg/ml.

#### **a) Effets des fractions d'ulvanes**

- Les ulvanes bruts

Une augmentation significative de la prolifération des fibroblastes est observée en présence des ulvanes bruts quelle que soit la concentration d'étude et le temps d'incubation. Cette augmentation significative de la prolifération est particulièrement marquée en présence de ces fractions :

- À la concentration de 50 µg/ml avec +39,6 ± 7,2% après 24 h d'incubation ( $p < 0,01$ , Figure 85A) et +56,2 ± 9,3%, après 48 h d'incubation ( $p < 0,001$ , Figure 85B).
- À la concentration de 1000 µg/ml avec +46,6 ± 13,4% après 24 h d'incubation ( $p < 0,05$ , Figure 85A) et +67,3 ± 9,5% après 48 h d'incubation ( $p < 0,001$ , Figure 85B).

L'augmentation de la prolifération en présence des ulvanes bruts aux autres concentrations (100, 250 et 500 µg/ml) est semblable après 24 h d'incubation (+26 ± 9%, Figure 85A) et 48 h d'incubation (+45 ± 13%, Figure 85B).

- Les ulvanes purifiés

Après 24 h d'incubation (Figure 85A), une augmentation significative de la prolifération des fibroblastes ( $p < 0,05$ ) est uniquement mise en évidence en présence des ulvanes purifiés par précipitation éthanolique à 250 µg/ml avec +21,9 ± 8,7% pour ceux obtenus par macération et +17,4 ± 7,3% pour ceux par EAE. Une augmentation non significative de +7,1% à +23,2% de la prolifération est également observée en présence de ces fractions aux autres concentrations testées (50, 100, 500 et 1000 µg/ml). Après 48 h d'incubation (Figure 85B), l'augmentation de la prolifération est significative en présence de ces fractions ( $p < 0,05$ ) pour toutes les concentrations testées sauf à 1000 µg/ml pour PP-UM (+33 ± 8%,  $p < 0,01$ ). Une augmentation significative de la prolifération (de +25 ± 11% à +27 ± 13%) est observée après 48 h d'incubation de manière dose-dépendante en présence des ulvanes purifiés par précipitation éthanolique obtenues par macération pour les concentrations de 50 à 500 µg/ml.

La prolifération des cellules augmente de manière significative après 24 h d'incubation en présence des ulvanes dialysés obtenus par macération aux concentrations les plus élevées de 500 et 1000 µg/ml ( $p < 0,05$ , Figure 85A) et par EAE à toutes les concentrations testées ( $p < 0,05$  pour 50, 250, 500 et 1000 µg/ml, et  $p < 0,01$  à 100 µg/ml, Figure 85A).

Après 48 h d'incubation (Figure 85B), l'augmentation significative maximale de la prolifération est constatée aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml en présence des ulvanes dialysés. En effet, cette augmentation de la prolifération atteint, en présence des ulvanes dialysés obtenus par EAE,  $+67,0 \pm 12,0\%$  à 50 µg/ml et  $+57,8 \pm 7,6\%$  à 1000 µg/ml.

De même, une augmentation significative de la prolifération des fibroblastes est montrée en présence des ulvanes purifiés par saturation au sulfate d'ammonium suivie de précipitation éthanolique et dialyse ( $p < 0,05$  après 24 h d'incubation, Figure 85A). La Figure 85B met en évidence que la prolifération des fibroblastes est significativement augmentée ( $p < 0,01$ ) en présence de ces ulvanes aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml pour ceux issus de macération ( $+59,9 \pm 16,1\%$  et  $+55,4 \pm 9,9\%$  respectivement) et à 1000 µg/ml pour ceux issus d'EAE ( $+49,0 \pm 10,1\%$ ) après 48 h d'incubation.

En considérant donc l'effet des ulvanes purifiés à la concentration de 1000 µg/ml après 48 h d'incubation, la prolifération des fibroblastes est davantage augmentée en présence des ulvanes dialysés ( $+61,9 \pm 10,1\%$  maximum,  $p < 0,001$ ) en comparaison avec les autres fractions purifiées.

#### **b) Effets des fractions d'oligo-ulvanes**

La Figure 85A montre qu'après 24 h d'incubation, la prolifération des fibroblastes est augmentée de manière significative ( $p < 0,05$ ) uniquement en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire issus d'EAE à 1000 µg/ml. Après 48 h d'incubation (Figure 85B), l'augmentation de la prolifération cellulaire est dose-dépendante en présence de ces ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire et atteint  $+50,1 \pm 7,7\%$   $+68,2 \pm 7,3\%$  à 1000 µg/ml pour ceux issus de macération et EAE respectivement ( $p < 0,001$ ).

La prolifération des fibroblastes est stimulée de manière significative après 24 h d'incubation (Figure 85A) en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide issus de macération aux concentrations de 50, 100, 250 et 1000 µg/ml (de  $+23,1 \pm 4,2$  à  $+40,3 \pm 8,0$ ,  $p < 0,01$ ) et ceux issus d'EAE aux concentrations de 50, 100, 500 et 1000 µg/ml (de  $+13,7 \pm 5,2$  à  $26,1 \pm 7,7\%$ ,  $p < 0,05$ ). Après 48 h d'incubation (Figure 85B), une augmentation de la prolifération des fibroblastes dose-dépendante est observée en présence des ulvanes dépolymérisées par hydrolyse acide pour les concentrations de 100 à 1000 µg/ml. Ainsi, l'augmentation significative est maximale en présence de ces ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide à la concentration de 1000 µg/ml avec  $+45,1 \pm 7,9\%$  et  $+35,7 \pm 6,7\%$  pour ceux issus de macération et EAE respectivement.

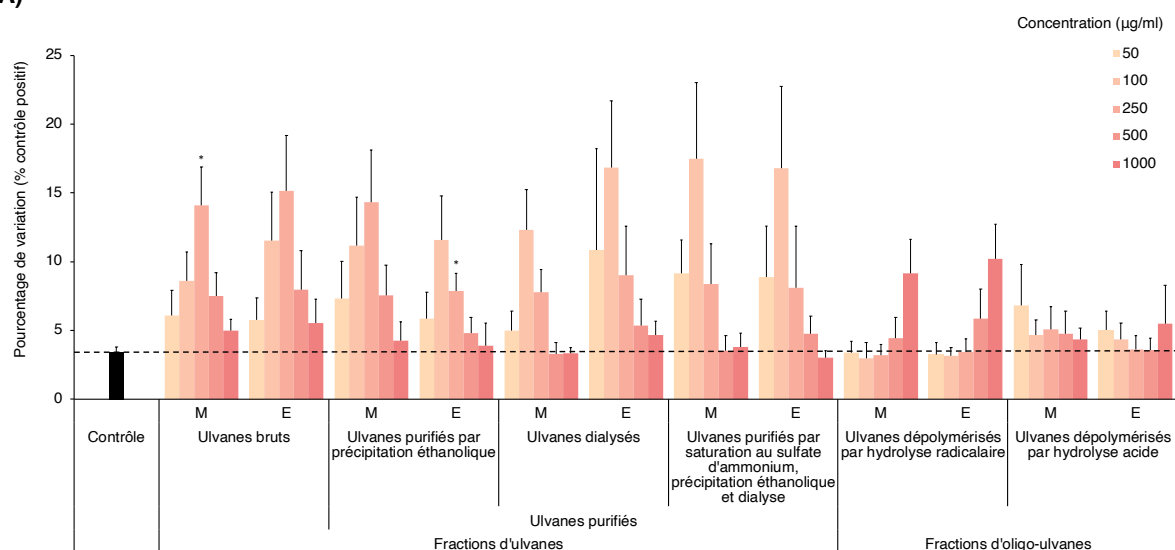
Ainsi, les résultats mettent en évidence que la prolifération des fibroblastes est significativement augmentée ( $p < 0,01$ ) en présence des fractions d'oligo-ulvanes et de façon maximale à 1000 µg/ml après 48 h d'incubation. Par ailleurs, une réponse dose-dépendante de la prolifération cellulaire a été montrée en présence de ces fractions d'oligo-ulvanes.

## 2. Évaluation de la cytotoxicité potentielle des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur les fibroblastes en culture

Des fibroblastes issus du derme de trois sujets sont incubés 24 h et 48 h en présence des fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et purifiés) et d'oligo-ulvanes (ulvanes dépolymérisés) issues d'*Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E).

La Figure 86 représente, en pourcentage de variation par rapport au contrôle positif maximal de relargage de LDH (100%), les résultats obtenus sur la cytotoxicité des fractions aux concentrations de 50, 100, 250, 500 et 1000 µg/ml sur les fibroblastes après (A) 24 h et (B) 48 h d'incubation.

(A)



(B)

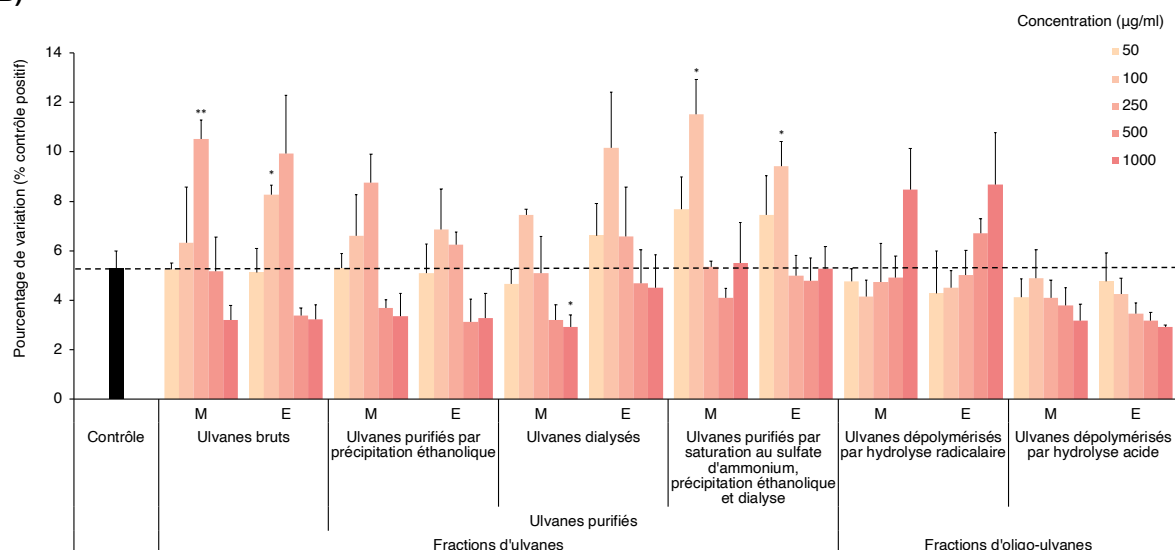


Figure 86 : Évaluation de la cytotoxicité potentielle des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E) sur des fibroblastes dermiques humains en culture après (A) 24 h et (B) 48 h d'incubation, aux concentrations de 50, 100, 250, 500 et 1000 µg/ml, évalués par le dosage de la LDH

Les valeurs sont les moyennes ± erreurs standards. Le contrôle indiqué est le contrôle négatif correspondant au niveau basal de libération de LDH par les cellules. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données (\* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ ),  $n=3$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 32, 35 et 43 ans).

La Figure 86 montre qu'il n'y a pas d'augmentation significative de libération de LDH et donc de mortalité cellulaire en présence des différentes fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes aux concentrations de 50, 500 et 1000 µg/ml, après 24 et 48 h d'incubation en comparaison avec le contrôle.

Une augmentation significative de la mortalité cellulaire, est constatée uniquement en présence des ulvanes bruts obtenus par macération après 24 h ( $+10,6 \pm 2,8\%$ ,  $p < 0,05$ , Figure 86A) et 48 h d'incubation ( $+5,2 \pm 0,8\%$ ,  $p < 0,01$ , Figure 86B) à la concentration de 250 µg/ml, et par EAE après 48 h d'incubation à la concentration de 100 µg/ml ( $+3,9 \pm 0,4\%$ ,  $p < 0,05$ , Figure 86B). En présence des ulvanes purifiés par précipitation éthanolique obtenus par EAE à la concentration 250 µg/ml, une augmentation significative ( $+4,4 \pm 1,3\%$ ,  $p < 0,05$ ) de la mort cellulaire est observée après 24 h d'incubation (Figure 86A). Une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la mort cellulaire est constatée après 48 h d'incubation (Figure 86B) en présence des ulvanes purifiés par saturation au d'ammonium suivie de précipitation éthanolique et dialyse, qu'ils soient obtenus par macération ou EAE à la concentration de 100 µg/ml ( $+4,9 \pm 1,4\%$  et  $+6,2 \pm 1,4\%$  respectivement).

En résumé, les résultats de WST-1 mettent en évidence que les différentes fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. stimulent la prolifération des fibroblastes. Aussi, l'augmentation de la prolifération est meilleure après 48 h d'incubation des fibroblastes en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. Par ailleurs, les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml augmentent la prolifération soit de façon maximale soit de façon dose-dépendante. En complément, le dosage de la LDH a montré que les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes aux deux concentrations de 50 et 1000 µg/ml ne présentent pas de cytotoxicité significative pour les fibroblastes en culture.

Finalement, ces deux concentrations (50 et 1000 µg/ml) et le temps d'incubation de 48 h ont été considérés pour les prochaines évaluations biologiques sur la MEC.

Par ailleurs, le procédé d'extraction aqueux utilisé (macération ou EAE) ne semble pas impacter différemment l'effet des fractions sur la prolifération et la viabilité des fibroblastes.

## **B. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression et la synthèse de composants de la matrice extracellulaire des fibroblastes**

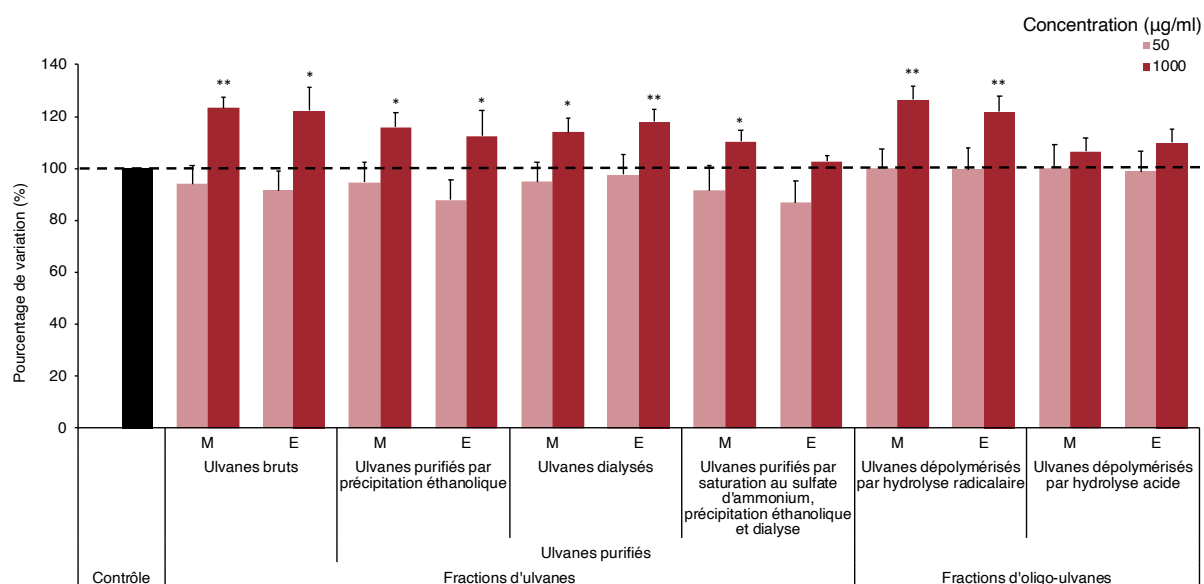
---

### **1. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la synthèse de collagène total**

La synthèse de collagène total par les fibroblastes a été évaluée en présence des différentes fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et purifiés) et d'oligo-ulvanes (ulvanes dépolymérisés) aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml après 48 h d'incubation (Figure 87).

Après incubation, une coloration au rouge Sirius a été réalisée et le colorant fixé aux fibres cationiques de collagène est solubilisé puis dosé.

La Figure 87 montre que la synthèse de collagène total par les fibroblastes n'est pas significativement modulée en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à la concentration de 50 µg/ml. Toutefois, à la concentration de 1000 µg/ml, la majorité des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes permettent de stimuler significativement la synthèse de collagène total par les fibroblastes (+20% environ). La significativité des résultats permet de distinguer deux groupes de fractions. En effet, l'augmentation de la synthèse de collagène par les fibroblastes est plus significative ( $p < 0,01$ ) en présence des ulvanes bruts issus de macération (+23 ± 4,3%), des ulvanes dialysés issus d'EAE (+18,1 ± 4,6%) et des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire (DEP-HD PP-UM : +26,6 ± 5,3% et DEP-HD PP-UE : +21,8 ± 6,0%). Une augmentation de la synthèse de collagène total de significativité  $p < 0,05$  est observée en présence des ulvanes bruts issus d'EAE (+22,3 ± 9,0%), des ulvanes purifiés par précipitation éthanolique (PP-UM : +15,9 ± 5,4% et PP-UE : +12,5 ± 9,8%), des ulvanes dialysés issus de macération (+13,9 ± 5,7%) et des ulvanes purifiés par saturation au sulfate d'ammonium suivie de précipitation éthanolique et dialyse issus de macération (+10,4 ± 4,2%). La Figure 87 met également en évidence que les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide n'ont aucun impact significatif sur la synthèse de collagène total par les fibroblastes.



**Figure 87 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E) sur la synthèse de collagène total par les fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation, aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml, évalués par le test au rouge Sirius**

Les valeurs sont les moyennes ± erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données (\* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ ),  $n=6$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 32, 35, 36, 40, 43 et 45 ans).

En s'appuyant sur ces résultats d'activités biologiques (prolifération des fibroblastes, non-cytotoxicité et synthèse de collagène total), et sur les différences de composition biochimique et de poids moléculaire des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes (cf Tableau XIV, p. 184), certaines fractions ont été sélectionnées. En effet, les fractions issues de l'algue *Ulva* sp. obtenues par macération et EAE dont les effets ont ensuite été évalués sur l'anabolisme et le catabolisme matriciel, correspondent aux fractions d'ulvanes : ulvanes bruts et ulvanes dialysés, et fractions d'oligo-ulvanes : ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire et ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide.

## 2. Régulation de l'expression des collagènes de type I et III de la MEC par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes

Pour les analyses réalisées au niveau transcriptionnel, les ARN totaux ont été extraits à partir de culture de fibroblastes incubés 48 h en présence des différentes fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et dialysés) et d'oligo-ulvanes (ulvanes dépolymérisés) aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml.

Après transcription inverse des ARNm en ADNc, des expériences de PCR en temps réel ont été réalisées et les niveaux moyens d'expression des ARNm correspondant ont donc été estimés.

Les résultats ont été normalisés en utilisant comme référence l'ARNm de *RPL13A*, selon la méthode du  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , et sont exprimés en ratio relatif par rapport au contrôle.

Pour les études de la néosynthèse protéique, les fibroblastes ont été incubés pendant 48 h avec les différentes fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml. Les effets de ces fractions ont été étudiés sur la synthèse protéique de procollagène de type I par ELISA et collagène de type I mature par Western Blot, et sur la synthèse de collagène de type III par Western Blot uniquement.

### a) Effets sur le niveau d'expression des ARNm de *COL1A1* et *COL1A2* et la néosynthèse du collagène de type I

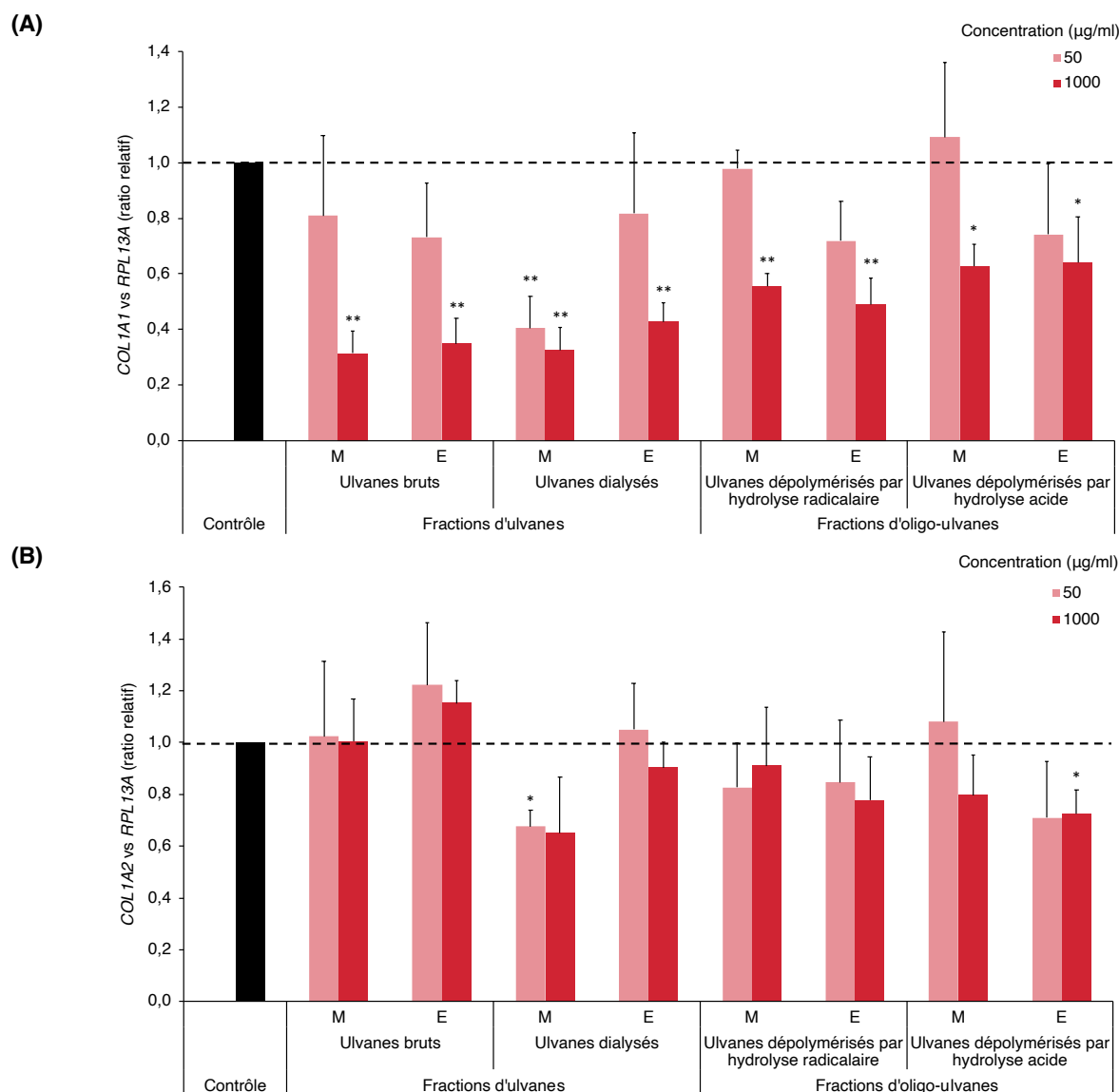
- i. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur le niveau d'expression des ARNm codant le collagène de type I

Les niveaux moyens d'expression des ARNm de *COL1A1* (Figure 88A), qui code pour la chaîne alpha 1 du collagène de type I, et *COL1A2* (Figure 88B), qui code pour la chaîne alpha 2 du collagène de type I, ont été évalués après 48 h d'incubation en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes.

La Figure 88A met en évidence une diminution significative ( $p < 0,01$  ou  $p < 0,05$ ) du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* après 48 h d'incubation en présence de toutes les fractions testées à la concentration de 1000 µg/ml. Cette diminution du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* est comprise entre un facteur 1,6 et 3,2, et est maximale en présence des ulvanes bruts ( $p < 0,01$ ) à cette concentration de 1000 µg/ml.

Une diminution significative ( $p < 0,01$ ) de  $59 \pm 11\%$  du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* en présence des ulvanes dialysés issus de macération à 50 µg/ml est également mise en évidence. Par ailleurs, une diminution non significative du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* est observée en présence des ulvanes bruts et des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire issus d'EAE à 50 µg/ml. Les autres fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à 50 µg/ml ne modulent pas le niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1*.

La diminution du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* semble être dose-dépendante en présence de toutes les fractions.



**Figure 88 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml, sur le niveau d'expression des ARNm de (A) *COL1A1* et (B) *COL1A2* de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation**

Les niveaux d'expression des ARNm sont normalisés en utilisant le gène *RPL13A* et exprimés en ratio relatif par rapport au contrôle. Les valeurs sont les moyennes ± erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données (\* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ ),  $n=4$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 29, 33 et 42 ans).

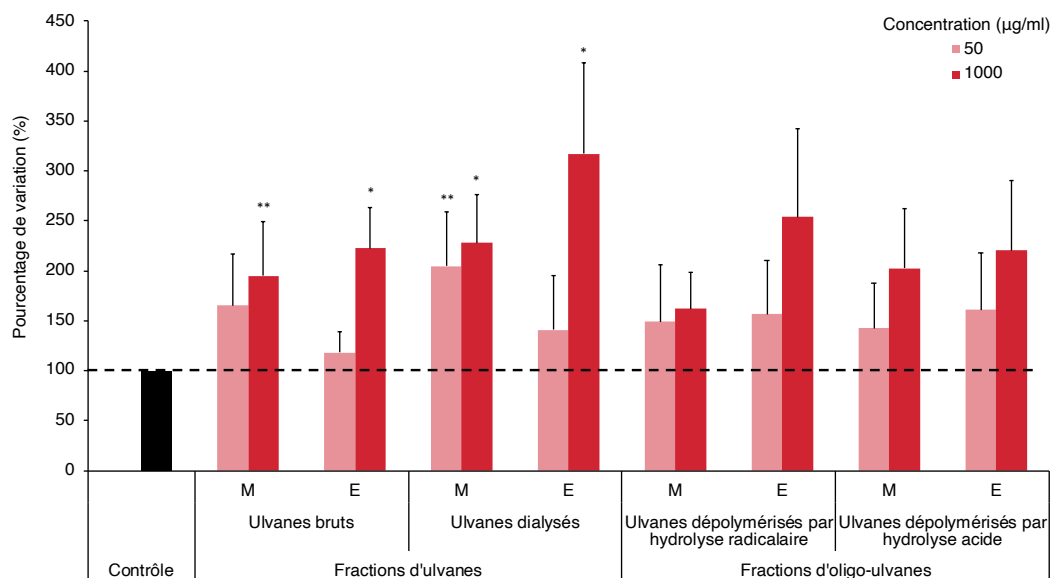
La Figure 88B présente les résultats obtenus sur le niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A2* après 48 h d'incubation. Une diminution significative ( $p < 0,05$ ), par rapport au contrôle, du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A2* est observée en présence des ulvanes dialysés issus de macération à 50 µg/ml (diminution d'un facteur 1,5) et en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide issus d'EAE à 1000 µg/ml (diminution d'un facteur 1,4). Aucune différence significative du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A2* en présence des autres fractions d'ulvanes n'est constatée à 50 µg/ml. Néanmoins, le niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A2* est diminué de manière non significative en présence des ulvanes dialysés issus de macération, des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire issus d'EAE et par hydrolyse acide issus de macération à la concentration de 1000 µg/ml.



ii. Néosynthèse du collagène de type I en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes

La néosynthèse protéique du collagène de type I en présence des différentes fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes a été analysée en s'intéressant au procollagène de type I alpha 1 par ELISA (Figure 89) et au collagène de type I mature par Western Blot (Figure 90). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport au contrôle.

L'analyse par ELISA de procollagène de type I néosynthétisé, libéré dans l'espace extracellulaire, est réalisée au niveau des surnageants de culture cellulaire des fibroblastes.



**Figure 89 : Néosynthèse du procollagène de type I alpha 1 par les fibroblastes dermiques humains en culture, après 48 h d'incubation, en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml, évaluée par un dosage ELISA**

Les valeurs sont les moyennes ± erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données (\* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ ),  $n=6$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 29, 33, 36, 42 et 45 ans).

La synthèse de collagène de type I présente une réponse dose-dépendante en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes avec de ce fait une plus forte augmentation de la synthèse à la concentration de 1000 µg/ml.

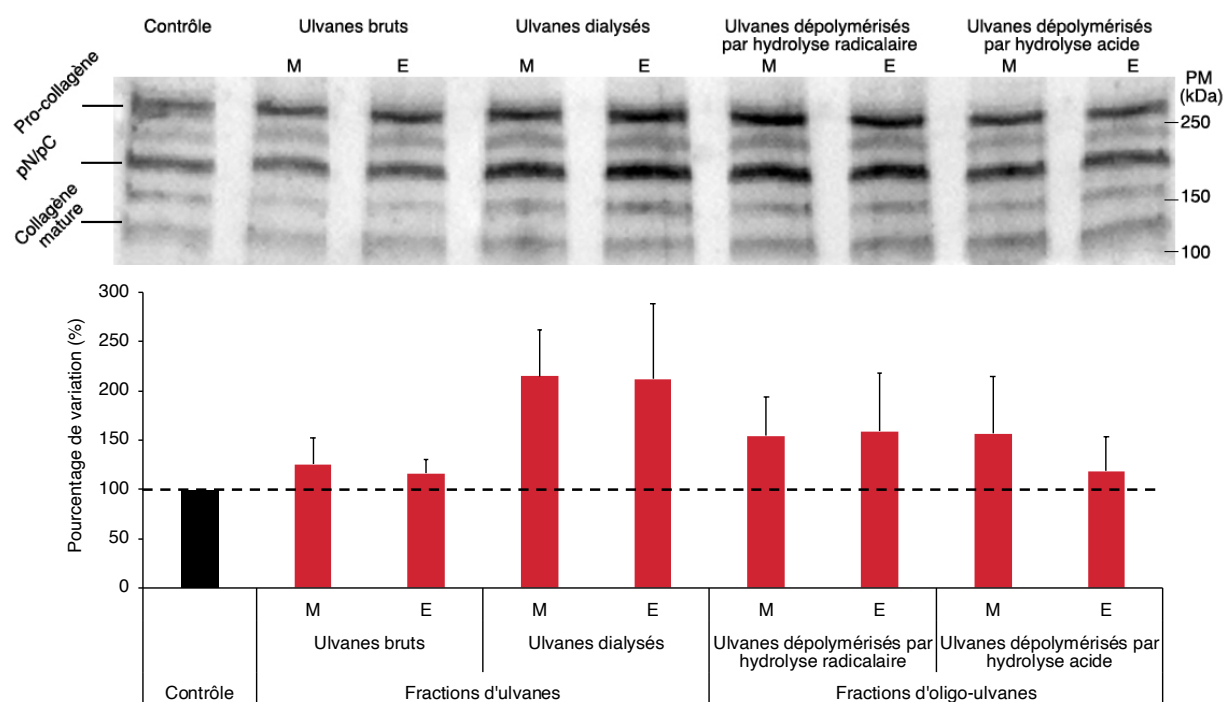
La Figure 89 montre, qu'après incubation, une augmentation significative de la synthèse de procollagène de type I est observée, en considérant la concentration de 50 µg/ml, en présence des ulvanes dialysés issus de macération ( $+104,5 \pm 54,9\%$ ,  $p < 0,01$ ). De plus, une augmentation non significative de la synthèse de procollagène de type I, en présence des ulvanes bruts issus de macération ( $+65,0 \pm 52,0\%$ ), et des ulvanes issus d'EAE dépolymérisés par hydrolyse radicalaire ( $+56,8 \pm 53,8\%$ ) et acide ( $+61,1 \pm 56,8\%$ ) à la concentration de 50 µg/ml est mesurée.

La Figure 89 met également en évidence une augmentation de la synthèse protéique de procollagène de type I en présence de toutes les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à la concentration de 1000 µg/ml. Toutefois, cette augmentation est significative uniquement en présence des ulvanes bruts ( $p < 0,01$  avec UM :  $+94,9 \pm 54,6\%$  et  $p < 0,05$  avec UE :  $+122,3 \pm 41,5\%$ ), et des ulvanes dialysés ( $p < 0,05$ , DS-UM :  $+128,0 \pm 48,7\%$  et DS-UE :  $+217,0 \pm 91,7\%$ ).

La Figure 90 représente à la fois une membrane représentative d'un Western Blot (WB) évaluant la synthèse de collagène de type I ainsi que le graphique de quantification du collagène de type I mature associé aux expérimentations de WB ( $n=5$ ). L'analyse par WB de la synthèse de collagène de type I mature est faite au niveau du tapis cellulaire des fibroblastes.

Le collagène est une protéine globulaire particulière qui se compose de trois chaînes  $\alpha$  (2 chaînes  $\alpha 1$  et 1 chaîne  $\alpha 2$ ). Sur la membrane de WB de collagène de type I sont indiqués les différents poids moléculaires du procollagène (250 kDa), du pN/pC (190 kDa) et du collagène mature (130 kDa) identifiés. Le pN/pC collagène correspond au pN-collagène de type I et au pC-collagène de type I, générés à partir du procollagène par clivage enzymatique des C-propeptides et N-propeptides respectivement.

Les autres bandes visibles sur le WB peuvent correspondre à différents états de maturation de la protéine (plus ou moins hydroxylée) ou bien à du collagène incomplet (chaîne  $\alpha 1$  : 138 kDa ou chaîne  $\alpha 2$  : 129 kDa) (Bouyoucef *et al.*, 2018).



**Figure 90 : Néosynthèse du collagène de type I mature par les fibroblastes dermiques humains en culture, après 48 h d'incubation, en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), à la concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , évaluée par Western Blot**

Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test  $t$  de Student,  $n=5$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 29, 33, 36, 42 et 45 ans). Une membrane représentative du WB de l'évaluation de la synthèse de collagène de type I est présentée au-dessus du graphique (PM : poids moléculaire ; pN/pC : pN-collagène/pC-collagène).

Ces résultats de WB présentés sur la Figure 90 vont également dans le sens d'une augmentation de la synthèse de collagène de type I en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à la concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Néanmoins, cette augmentation est non significative en présence de toutes les fractions. Il est intéressant de noter que, comme précédemment, la synthèse de collagène de type I mature est davantage stimulée en présence des ulvanes dialysés (DS-UM :  $+115,3 \pm 46,6\%$  et DS-UE :  $+112,3 \pm 76,8\%$ ) que les autres fractions.

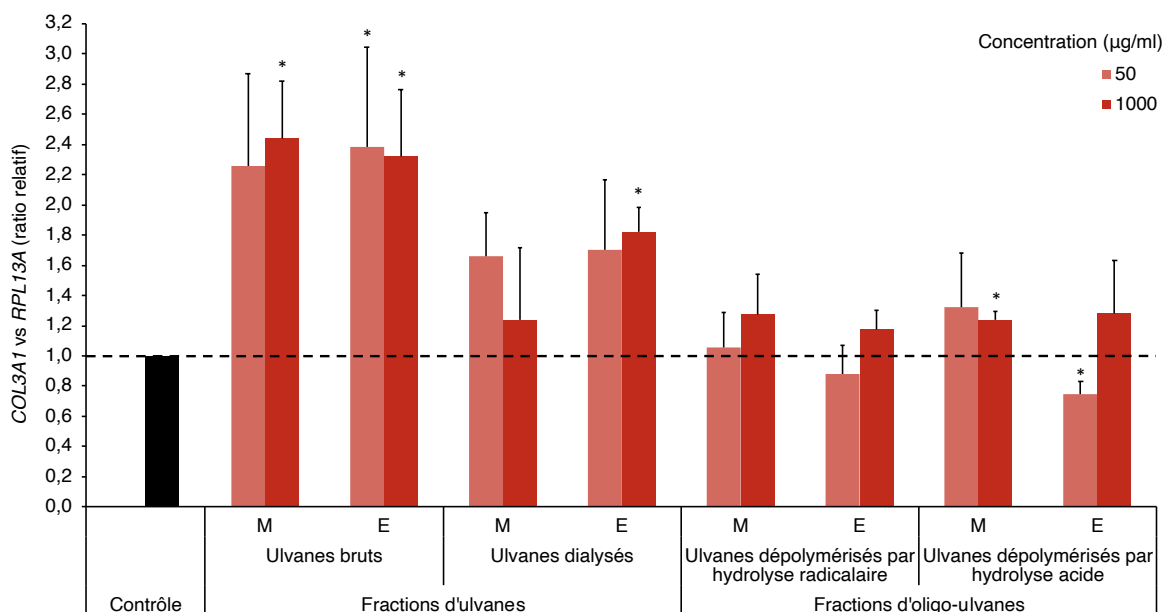
Par ailleurs, les résultats sur la stimulation de la synthèse du collagène de type I en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes obtenus par ELISA et Western Blot sont complémentaires. En effet, l'augmentation de la synthèse de procollagène de type I alpha 1, démontrée par ELISA, est corrélée à l'augmentation de la synthèse de collagène de type I mature au niveau du tapis cellulaire, démontrée par Western Blot.

Il est également mis en évidence que les ulvanes dialysés, plus riches en sucres, acides uroniques et sulfates, que les ulvanes bruts, présentent une meilleure activité sur la synthèse protéique de procollagène de type I alpha 1 et de collagène de type I mature.

## b) Effets sur le niveau d'expression des ARNm de *COL3A1* et la néosynthèse du collagène de type III

- i. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur le niveau d'expression des ARNm codant le collagène de type III

Le niveau moyen d'expression des ARNm de *COL3A1*, qui code pour la chaîne alpha 1 du collagène de type III, a été évalué après 48 h d'incubation en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml (Figure 91).



**Figure 91 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml, sur le niveau d'expression des ARNm de *COL3A1* de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation**

Les niveaux d'expression des ARNm sont normalisés en utilisant le gène *RPL13A* et exprimés en ratio relatif par rapport au contrôle. Les valeurs sont les moyennes ± erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données (\* :  $p < 0,05$ ),  $n=4$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 29, 33 et 42 ans).

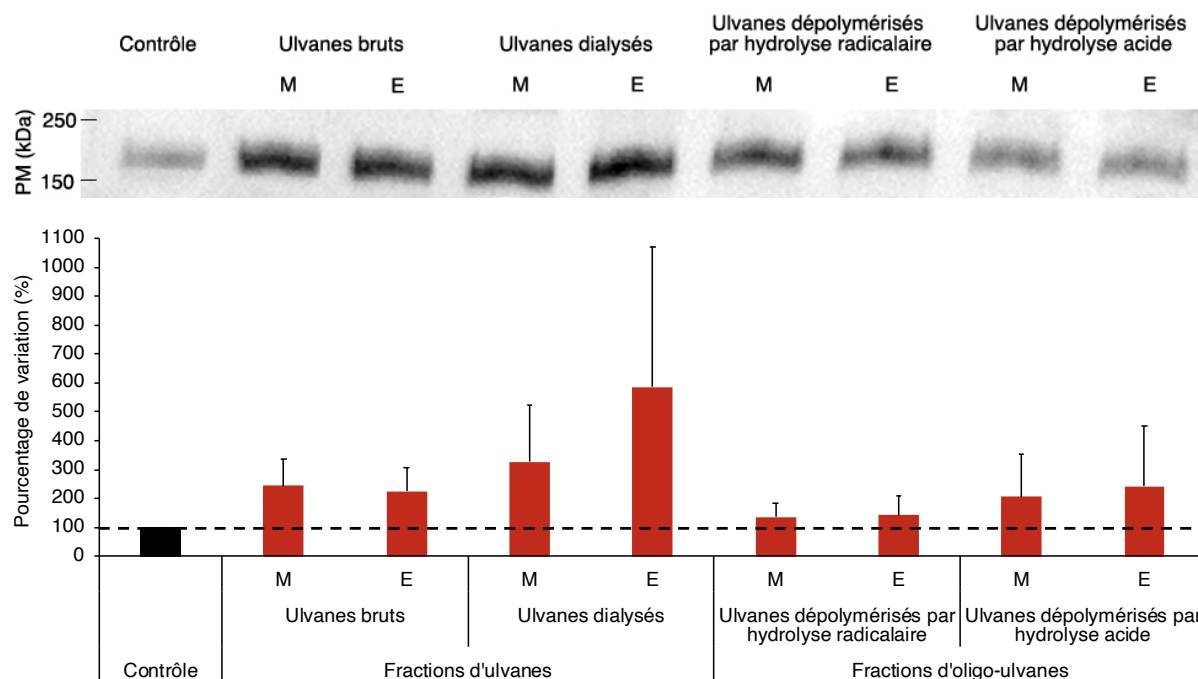
La Figure 91 met en évidence une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) par rapport au contrôle du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL3A1* en présence des ulvanes bruts (UM :  $+143,8 \pm 38,3\%$  et UE :  $+131,8 \pm 44,4\%$ ), des ulvanes dialysés (DS-UE :  $+81,9 \pm 16,4\%$ ) et des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide (DEP-AD PP-UM :  $+23,7 \pm 6,1\%$ ) à la concentration de 1000 µg/ml.

Le niveau moyen d'expression des ARNm de *COL3A1* est significativement diminué en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide issue d'EAE ( $-25,2 \pm 8,6\%$ ,  $p < 0,05$ ) et significativement augmenté en présence des ulvanes bruts issus d'EAE ( $+138,3 \pm 66,2\%$ ,  $p < 0,05$ ) en considérant la concentration de 50  $\mu\text{g/ml}$ . En revanche, aucune autre différence significative par rapport au contrôle n'est observée en présence des autres fractions à cette concentration de 50  $\mu\text{g/ml}$  malgré une augmentation non significative de  $+125,8 \pm 61,1\%$  en présence des ulvanes bruts issus de macération, et en présence des ulvanes dialysés (DS-UM :  $+65,7 \pm 28,8\%$  et DS-UE :  $+70,5 \pm 45,7\%$ ).

ii. Néosynthèse du collagène de type III en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes

La néosynthèse protéique du collagène de type III en présence des différentes fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes a été analysée par Western Blot (WB).

La Figure 92 indique à la fois une membrane représentative d'un WB évaluant la synthèse de collagène de type III (poids moléculaire de 150 - 170 kDa) et le graphique de quantification du collagène de type III associé aux expérimentations de WB ( $n=4$ ).



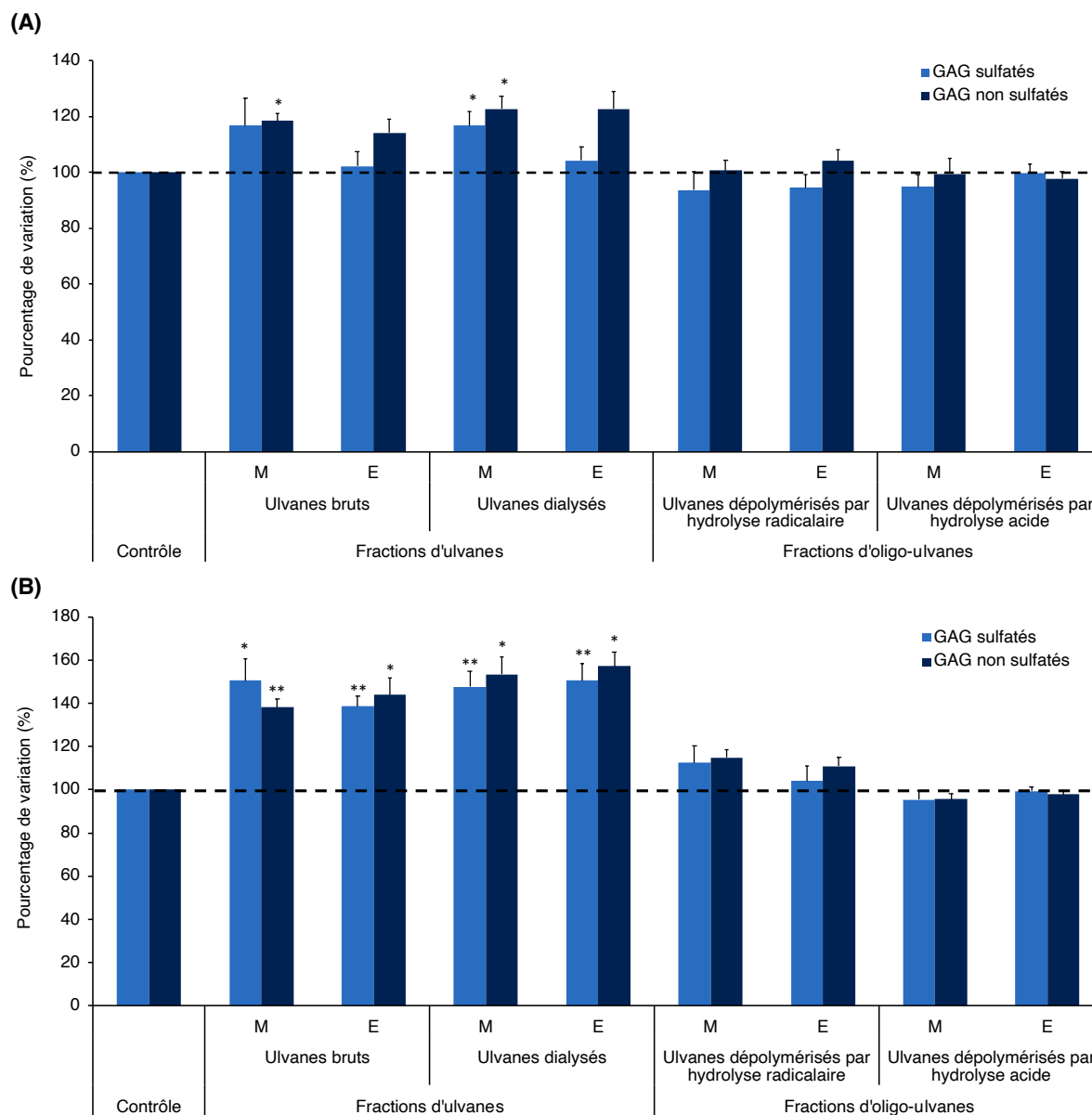
**Figure 92 : Néosynthèse du collagène de type III mature par les fibroblastes dermiques humains en culture, après 48 h d'incubation, en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), à la concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , évaluée par Western Blot**

Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données,  $n=4$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 29, 33, 42 et 45 ans). Une membrane représentative du Western Blot de l'évaluation de la synthèse de collagène de type III est présentée au-dessus du graphique (PM : poids moléculaire).

Sur la Figure 92 aucune différence significative de la synthèse de collagène de type III, par rapport au contrôle, n'est mesurée en présence des différentes fractions d'ulvanes à 1000  $\mu\text{g/ml}$ , après 48 h d'incubation. Toutefois, une augmentation non significative de sa synthèse est observée en présence des ulvanes bruts et des ulvanes dialysés obtenus par macération (UM :  $+144,2 \pm 92,6\%$  et DS-UM :  $+225,7 \pm 195,4\%$ ) et EAE (UE :  $+125,0 \pm 82,8\%$  et DS-UE :  $+485,7 \pm 484,9\%$ ).

### 3. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la synthèse de GAG sulfatés et non sulfatés

Afin d'observer l'effet potentiel des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la synthèse de GAG sulfatés et non sulfatés, des cultures primaires de fibroblastes sont incubées en présence des fractions aux concentrations de 50 µg/ml (Figure 93A) et 1000 µg/ml (Figure 93B) pendant 48 h. Après incubation, une coloration au bleu alcian est effectuée afin de marquer les GAG présents, qui sont ensuite solubilisés afin d'être dosés. Le pH est préalablement fixé à 1 afin de marquer les GAG sulfatés ou à 2,5 afin de marquer les GAG non sulfatés (acide hyaluronique principalement).



**Figure 93 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), aux concentrations de (A) 50 et (B) 1000 µg/ml, sur la synthèse de GAG sulfatés et non sulfatés par les fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation, évalués par le test au bleu alcian**

Les valeurs sont les moyennes ± erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student, la distribution normale des données étant vérifiée (\* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ ),  $n=4$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 29, 33, 40 et 42 ans).

En comparant les résultats obtenus sur la Figure 93A et B, une réponse dose-dépendante est observée sur la synthèse des GAG sulfatés et non sulfatés en présence des ulvanes bruts et des ulvanes dialysés.

La Figure 93A montre que la synthèse de GAG sulfatés et non sulfatés est significativement augmentée ( $p < 0,05$ ) en présence des fractions d'ulvanes issus de macération, à la concentration de 50  $\mu\text{g/ml}$ , comprenant les ulvanes bruts (UM :  $+18,5 \pm 2,5\%$  pour les GAG non sulfatés) et les ulvanes dialysés (DS-UM :  $+16,7 \pm 5,0\%$  et  $+22,7 \pm 6,1\%$  pour les GAG sulfatés et non sulfatés respectivement).

La Figure 93B met en évidence une augmentation significative ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ ) de la synthèse des GAG sulfatés ( $+38,7 \pm 4,4\%$  à  $+50,6 \pm 7,8\%$ ) et non sulfatés ( $+38,2 \pm 3,7\%$  à  $+57,3 \pm 6,6\%$ ) en présence des ulvanes bruts et dialysés à la concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Il est intéressant de noter que la synthèse de GAG non sulfatés semble significativement plus élevée en présence des ulvanes dialysés, fraction la plus riche en sucres, acides uroniques et sulfates.

Par ailleurs, les fractions d'oligo-ulvanes ne présentent aucun effet significatif sur la synthèse de GAG sulfatés et non sulfatés quelle que soit la concentration considérée (50 et 1000  $\mu\text{g/ml}$ ).

Les résultats obtenus concernant les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. sur la synthèse des composants de la MEC sont résumés dans le Tableau XV (p. 204).

Il a été démontré que la synthèse de composants de la MEC, comme les collagènes de type I (pro- et mature) et III au niveau protéique, et les GAG, est augmentée en présence des fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et dialysés) notamment à la concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , après 48 h d'incubation. Cette augmentation au niveau protéique s'accompagne dans le cas du collagène de type III, de l'augmentation du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL3A1*. Concernant les gènes du collagène de type I, cela n'est pas vérifié puisque le niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* diminue significativement.

En revanche, les fractions d'oligo-ulvanes n'ont pas une activité aussi marquée sur la synthèse de ces composants de la MEC. Pour exemple aucun effet significatif n'est mis en évidence sur la synthèse de GAG et la synthèse des collagènes de type I et III au niveau protéique. Aussi, au niveau de la synthèse de collagène total, des différences sont observées entre les deux fractions d'oligo-ulvanes, se traduisant par une perte d'activité nette en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide.

Par ailleurs, les conditions opératoires appliquées lors de la première étape d'extraction des ulvanes (par macération ou par EAE) ne semblent pas impacter différemment les activités de synthèse et d'expression de composants de la MEC par les fibroblastes (collagène total dont collagènes de type I et III, et GAG).

Chapitre 4 : Effet des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de la macroalgue *Ulva* sp. sur le métabolisme matriciel de fibroblastes dermiques humains en culture

Tableau XV : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E) sur la synthèse de composants de la MEC

		Fractions d'ulvanes				Fractions d'oligo-ulvanes				
		Ulvanes bruts		Ulvanes dialysés		Ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire		Ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide		
		M	E	M	E	M	E	M	E	
<b>Collagène total</b>	50 µg/ml	=	=	=	=	=	=	=	=	
	1000 µg/ml	↑**	↑*	↑*	↑**	↑**	↑**	=	=	
<b>Collagène de type I</b>	ARNm	50 µg/ml	= COL1A1 = COL1A2	↓ <sup>ns</sup> COL1A1 = COL1A2	↓** COL1A1 ↓* COL1A2	= COL1A1 = COL1A2	= COL1A1 = COL1A2	↓ <sup>ns</sup> COL1A1 = COL1A2	= COL1A1 = COL1A2	↓ <sup>ns</sup> COL1A2
		1000 µg/ml	↓** COL1A1 = COL1A2	↓** COL1A1 ↑ <sup>ns</sup> COL1A2	↓** COL1A1 ↓ <sup>ns</sup> COL1A2	↓** COL1A1 = COL1A2	↓* COL1A1 = COL1A2	↓** COL1A1 ↓ <sup>ns</sup> COL1A2	↓* COL1A1 ↓ <sup>ns</sup> COL1A2	↓* COL1A1 ↓* COL1A2
	Protéine ELISA	50 µg/ml	↑ <sup>ns</sup>	=	↑**	=	=	↑ <sup>ns</sup>	=	↑
		1000 µg/ml	↑**	↑*	↑*	↑*	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>
	Protéine Western Blot	50 µg/ml	=	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	=	=	=
		1000 µg/ml	=	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	=	=	=
<b>Collagène de type III</b>	ARNm COL3A1	50 µg/ml	↑ <sup>ns</sup>	↑*	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	=	=	=	↓*
		1000 µg/ml	↑*	↑*	=	↑*	=	=	↑*	=
	Protéine Western Blot	1000 µg/ml	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	=	=	=	=
<b>GAG sulfatés</b>	50 µg/ml	↑ <sup>ns</sup>	=	↑*	=	=	=	=	=	=
	1000 µg/ml	↑*	↑**	↑**	↑**	↑ <sup>ns</sup>	=	↓ <sup>ns</sup>	=	=
<b>GAG non sulfatés</b>	50 µg/ml	↑*	↑ <sup>ns</sup>	↑*	↑ <sup>ns</sup>	=	=	=	=	=
	1000 µg/ml	↑**	↑*	↑*	↑*	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↓ <sup>ns</sup>	↓ <sup>ns</sup>	↓ <sup>ns</sup>

↑ : augmentation ; ↓ : diminution ; = : pas de variation ; ns : non significatif ; \* : significatif en considérant  $p < 0,05$  ; \*\* : significatif en considérant  $p < 0,01$ .

## C. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression et l'activité de la MMP-1 et du TIMP-1 des fibroblastes

La MMP-1 est une collagénase qui dégrade majoritairement les collagènes de type I et III présents au niveau de la MEC du derme humain. La MMP-1 intervient ainsi dans la voie catabolique. Son activité protéolytique est régulée par les TIMP, notamment le TIMP-1.

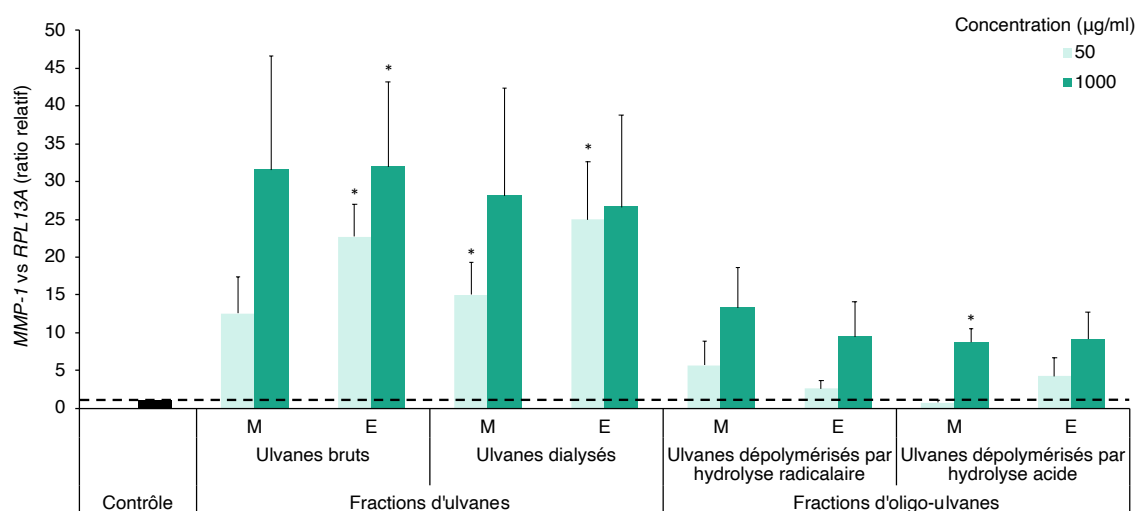
Afin d'étudier les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur le taux de la MMP-1 endogène active et sur son inhibiteur respectif, le TIMP-1, les fibroblastes du derme humain ont été incubés pendant 48 h avec les fractions.

### 1. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression, la néosynthèse par les fibroblastes et l'activité de la MMP-1

#### a) Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur le niveau d'expression des ARNm de *MMP-1*

Le niveau moyen d'expression des ARNm de *MMP-1* a été évalué après 48 h d'incubation en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml (Figure 94).

La Figure 94 met en évidence une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) du niveau moyen d'expression des ARNm de *MMP-1*, après 48 h d'incubation, en présence des ulvanes bruts issus d'EAE à 50 et 1000 µg/ml (facteur de  $22,7 \pm 4,3$  et  $32,0 \pm 15,0$  respectivement), des ulvanes dialysés à 50 µg/ml (DS-UM : facteur de  $15,0 \pm 4,3$  et DS-UE : facteur de  $25,0 \pm 7,7$ ) et des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide issus de macération à 1000 µg/ml (facteur de  $8,7 \pm 1,8$ ). Aussi, le niveau moyen d'expression des ARNm de *MMP-1* est augmenté de manière non significative en présence de toutes les autres fractions, à l'exception des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide issus de macération à 50 µg/ml.



**Figure 94 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml, sur le niveau d'expression des ARNm de *MMP-1* de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation**

Les niveaux d'expression des ARNm sont normalisés en utilisant le gène *RPL13A* et exprimés en ratio relatif par rapport au contrôle. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student (\* :  $p < 0,05$ ),  $n=4$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 29, 33 et 42 ans).



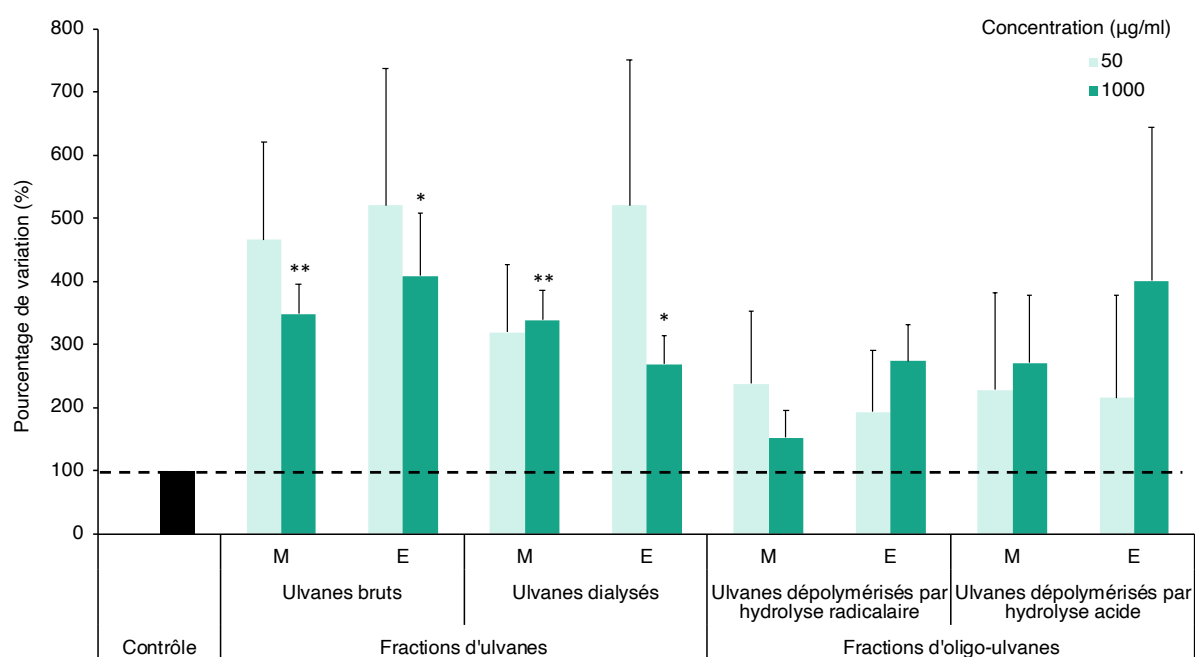
La Figure 94 montre également que l'augmentation du niveau moyen d'expression des ARNm de *MMP-1* est moins importante en présence des fractions d'oligo-ulvanes (ulvanes dépolymérisés) qu'en présence des fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et dialysés).

### b) Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la néosynthèse de la MMP-1

Les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml, ont été étudiés sur la synthèse protéique de la MMP-1 par test ELISA (Figure 95) après 48 h d'incubation avec les fibroblastes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport au contrôle.

La Figure 95 met en évidence une augmentation de la néosynthèse de la MMP-1, aux deux concentrations testées, en présence de toutes les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes de +52,8% à +420,6%. Cette augmentation de la synthèse de la MMP-1 est uniquement significative à la concentration de 1000 µg/ml, en présence des fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et dialysés) obtenus par macération ( $p < 0,01$ , UM : +248,1 ± 47,7% et DS-UM : +239,0 ± 46,4%) et EAE ( $p < 0,05$ , UE : +308,7 ± 99,4% et DS-UE : +169,0 ± 45,8%).

La Figure 95 montre également que l'augmentation de la synthèse de la MMP-1 est moins importante en présence des fractions d'oligo-ulvanes qu'en présence des fractions d'ulvanes.



**Figure 95 : Néosynthèse de la MMP-1 par les fibroblastes dermiques humains en culture, après 48 h d'incubation, en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml, évaluée par un dosage ELISA**

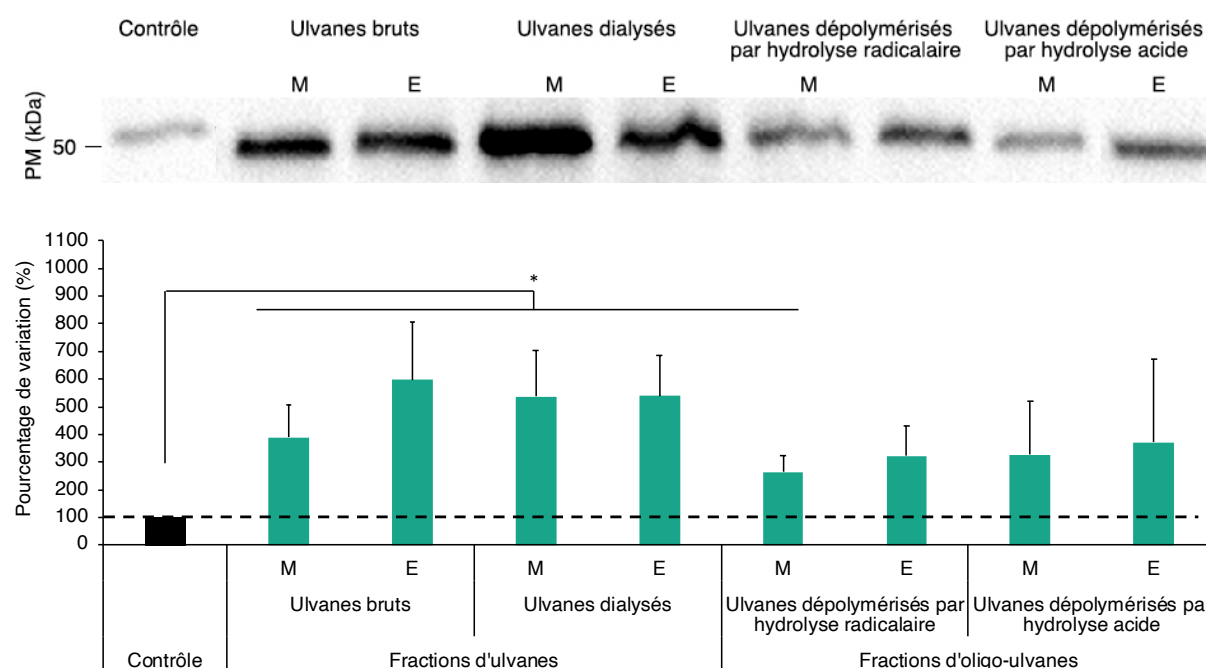
Les valeurs sont les moyennes ± erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données (\* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ ),  $n=4$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 33, 36 et 45 ans).

Les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes ont également été étudiés sur la synthèse protéique de la MMP-1 par Western Blot (WB) à la concentration de 1000 µg/ml (Figure 96). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport au contrôle.

La Figure 96 indique à la fois une membrane représentative d'un WB évaluant la synthèse de la MMP-1 (poids moléculaire de 50 kDa) et le graphique de quantification de la MMP-1 associé aux expérimentations de WB ( $n=6$ ).

La synthèse de la MMP-1 est augmentée en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à la concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Par ailleurs, cette augmentation de la néosynthèse de la MMP-1 par les fibroblastes est significative ( $p < 0,05$ ) en présence des ulvanes bruts (UM :  $+290,2 \pm 118,8\%$  et UE :  $+497,7 \pm 208,9\%$ ), des ulvanes dialysés (DS-UM :  $+437,6 \pm 167,8\%$  et DS-UE :  $+438,6 \pm 147,4\%$ ), et des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire issus de macération ( $+164,9 \pm 56,7\%$ ).

À nouveau, l'analyse par Western Blot met en évidence que l'effet sur la synthèse de la MMP-1 est moindre en présence des fractions d'oligo-ulvanes.



**Figure 96 : Néosynthèse de la MMP-1 par les fibroblastes dermiques humains en culture, après 48 h d'incubation, en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E) à la concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , évaluée par Western Blot**

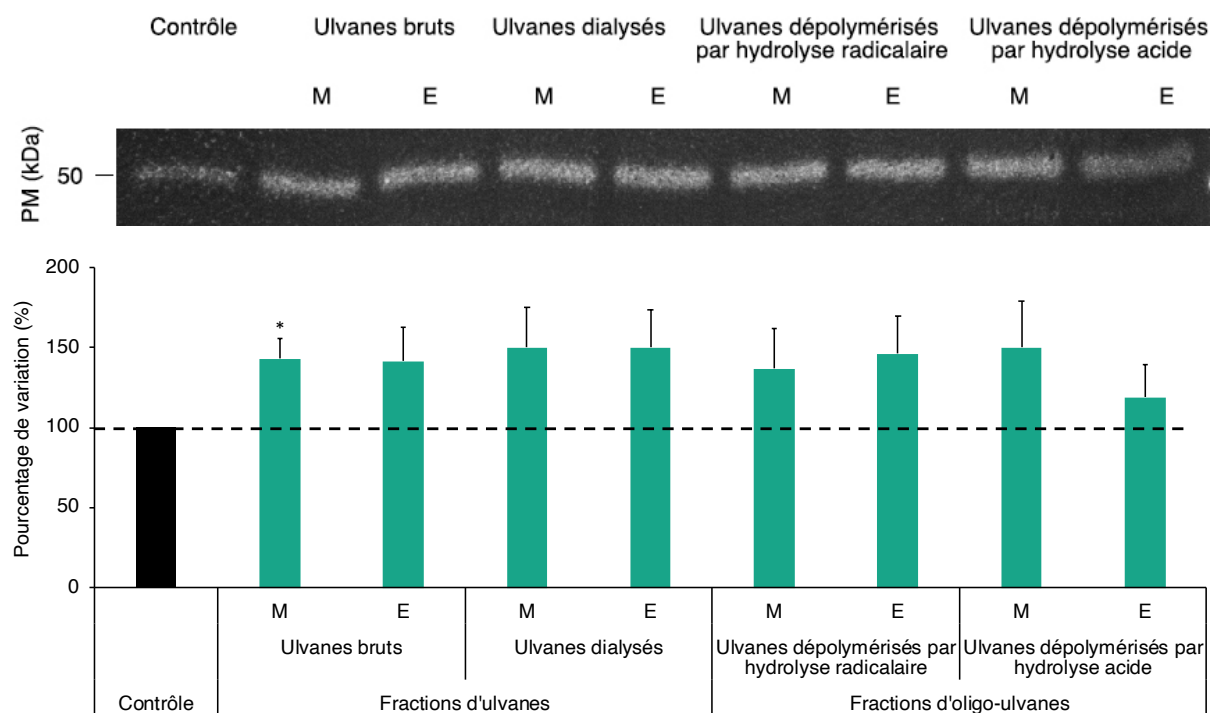
Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test  $t$  de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données (\* :  $p < 0,05$ ),  $n=6$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 29, 33, 36, 42 et 45 ans). Une membrane représentative du WB de l'évaluation de la synthèse de la MMP-1 est présentée au-dessus du graphique (PM : poids moléculaire).

### c) Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'activité enzymatique collagénase de la MMP-1

Les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à la concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$  sur l'activité enzymatique, collagénase, de la MMP-1 ont été déterminés par zymographie, après 48 h d'incubation avec les fibroblastes.

La Figure 97 indique à la fois une membrane représentative d'un zymogramme évaluant l'activité de la MMP-1 (poids moléculaire de 50 kDa) et le graphique de quantification de l'activité de la MMP-1 associé aux expérimentations de zymographie ( $n=4$ ).

La Figure 97 met en évidence que l'activité de la MMP-1 est augmentée (de  $+38,6 \pm 24,1\%$  à  $+50,3 \pm 25,1\%$ ) en présence de toutes les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, à l'exception des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide issus d'EAE. Toutefois, cette augmentation de l'activité de la MMP-1 est significative uniquement ( $p < 0,05$ ) en présence des ulvanes bruts issus de macération ( $+43,0 \pm 12,4\%$ ).



**Figure 97 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), à la concentration de 1000 µg/ml, sur l'activité enzymatique de la MMP-1 de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation, évalués par zymographie**

Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student (\* :  $p < 0,05$ ),  $n=4$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 33, 36, 42 et 45 ans). Une membrane représentative d'un zymogramme de l'évaluation de l'activité de la MMP-1 est présentée au-dessus du graphique (PM : poids moléculaire).

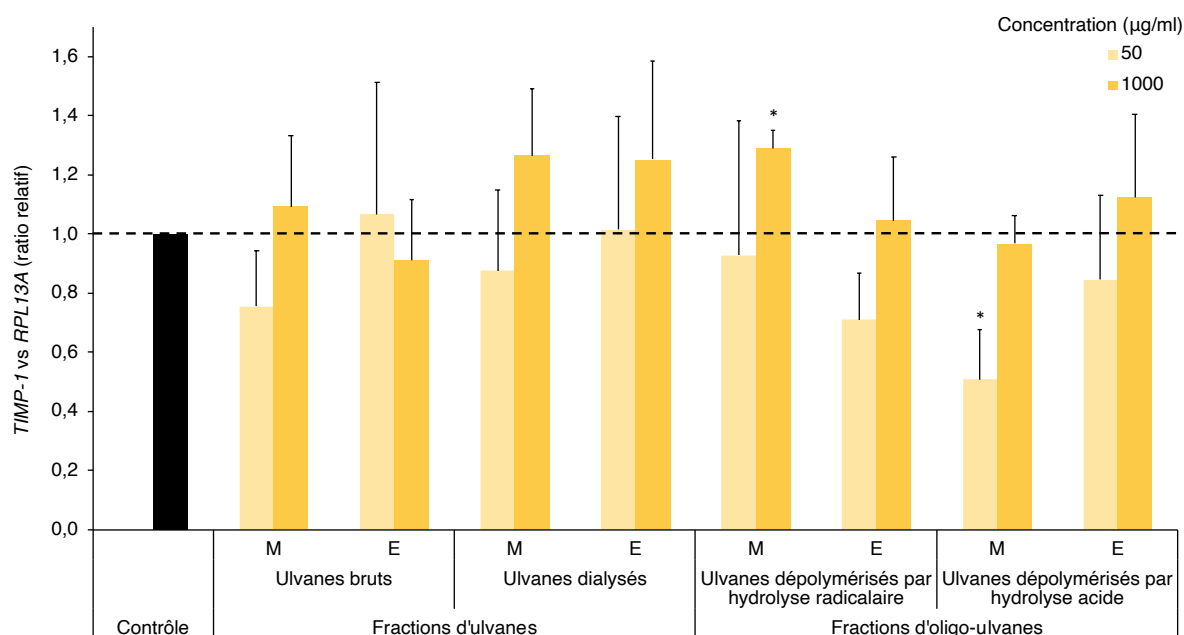
## 2. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression et la néosynthèse du TIMP-1 par les fibroblastes

### a) Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur le niveau d'expression des ARNm de *TIMP-1*

Le niveau moyen d'expression des ARNm de *TIMP-1* a été évalué après 48 h d'incubation en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml (Figure 98).

La Figure 98 met en évidence que le niveau moyen d'expression des ARNm de *TIMP-1* n'est pas significativement modifié en présence de la majorité des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, après 48 h d'incubation. Le niveau moyen d'expression des ARNm de *TIMP-1* est significativement diminué en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide issus de macération à 50 µg/ml ( $p < 0,05$ , facteur 2) et non significativement à cette même concentration en présence des ulvanes bruts issus de macération et des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire issus d'EAE à 50 µg/ml.

Toutefois, le niveau moyen d'expression des ARNm de *TIMP-1* est significativement augmenté en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire issus de macération à 1000 µg/ml ( $p < 0,05$ , facteur 1,29).



**Figure 98 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml, sur le niveau d'expression des ARNm de *TIMP-1* de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation**

Les niveaux d'expression des ARNm sont normalisés en utilisant le gène *RPL13A* et exprimés en ratio relatif par rapport au contrôle. Les valeurs sont les moyennes ± erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données (\* :  $p < 0,05$ ),  $n=4$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 29, 33 et 42 ans).

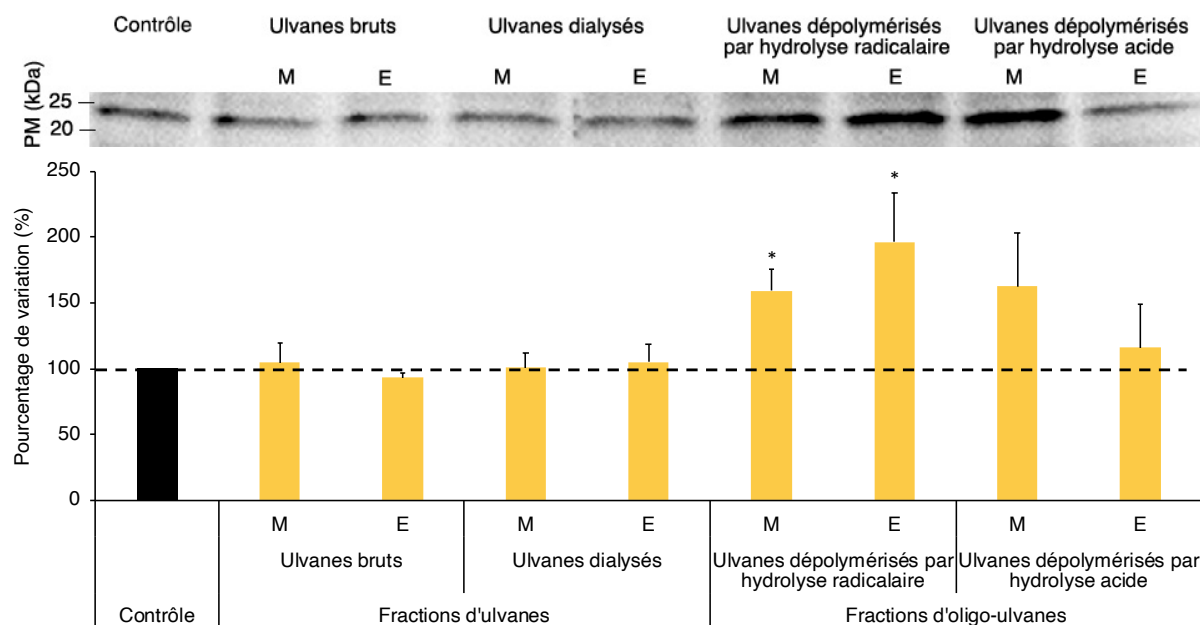
### b) Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la néosynthèse du TIMP-1

Les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes ont été étudiés sur la synthèse protéique du TIMP-1 par Western Blot (WB) à la concentration de 1000 µg/ml, après 48 h d'incubation avec les fibroblastes (Figure 99). Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport au contrôle.

La Figure 99 indique à la fois une membrane représentative d'un WB évaluant la synthèse du TIMP-1 (poids moléculaire de 22 kDa) et le graphique de quantification du TIMP-1 associé aux expérimentations de WB ( $n=5$ ).

La Figure 99 met en évidence que la synthèse du TIMP-1 est significativement augmentée ( $p < 0,05$ ) en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire issus de macération (+59,1 ± 16,7%) et d'EAE (+96,3 ± 37,1%). La synthèse du TIMP-1 est augmentée de façon non significative en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide issus de macération (+62,7 ± 40,4%).

Cette augmentation de la synthèse du TIMP-1 va dans le sens d'un niveau plus faible de la MMP-1 en présence des fractions d'oligo-ulvanes en comparaison avec les fractions d'ulvanes. Par ailleurs, la synthèse du TIMP-1 par les fibroblastes n'est pas significativement modifiée en présence des fractions d'ulvanes.



**Figure 99 : Néosynthèse du TIMP-1 par les fibroblastes dermiques humains en culture, après 48 h d'incubation, en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), à la concentration de 1000 µg/ml, évaluée par Western Blot**

Les valeurs sont les moyennes ± erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données (\* :  $p < 0,05$ ),  $n=5$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 29, 33, 36, 42 et 45 ans). Une membrane représentative du WB de l'évaluation de la synthèse du TIMP-1 est présentée au-dessus du graphique (PM : poids moléculaire).

Les résultats obtenus concernant les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. sur l'expression de la MMP-1 et du TIMP-1 sont résumés dans le Tableau XVI.

Les résultats ont montré que l'expression et la synthèse de la MMP-1 aux niveaux transcriptomique et protéomique ainsi que l'activité enzymatique de la MMP-1 sont augmentées en présence de toutes les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, notamment à la concentration de 1000 µg/ml. Les résultats ont également mis en évidence que cette augmentation est moindre en présence des fractions d'oligo-ulvanes. Ceci concorde notamment avec l'augmentation significative de la synthèse du TIMP-1 au niveau protéique en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire à la concentration de 1000 µg/ml.

À nouveau, les conditions opératoires appliquées lors de la première étape d'extraction des ulvanes (par macération ou par EAE) ne semblent pas impacter différemment l'expression, la synthèse et l'activité de la MMP-1 ainsi que l'expression et la synthèse du TIMP-1.

Tableau XVI : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E) sur le catabolisme matriciel de fibroblastes et son inhibition

			Fractions d'ulvanes				Fractions d'oligo-ulvanes				
			Ulvanes bruts		Ulvanes dialysés		Ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire		Ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide		
			M	E	M	E	M	E	M	E	
MMP-1	ARNm MMP-1	50 µg/ml	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↓ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	
		1000 µg/ml	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>ns</sup>	
	Protéine	ELISA									
		50 µg/ml	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	=	=	=	
		1000 µg/ml	↑ <sup>**</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>**</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	
		Western Blot 1000 µg/ml	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	=	
Zymographie 1000 µg/ml	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	↑ <sup>ns</sup>	=			
TIMP-1	ARNm TIMP-1	50 µg/ml	↓ <sup>ns</sup>	=	=	=	=	↓ <sup>ns</sup>	↓ <sup>*</sup>	=	
		1000 µg/ml	=	=	=	=	↑ <sup>*</sup>	=	=	=	
	Protéine Western Blot 1000 µg/ml	=	↓ <sup>ns</sup>	=	=	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>*</sup>	↑ <sup>ns</sup>	=		

↑ : augmentation ; ↓ : diminution ; = : pas de variation ; ns : non significatif ; \* : significatif en considérant  $p < 0,05$  ; \*\* : significatif en considérant  $p < 0,01$ .

#### D. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression du *TGF-β*, des *SMAD* et de la sous-unité *p65* de NF-κB

Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu par les différentes fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la synthèse des composants matriciels, des études préliminaires ont porté sur l'évaluation de l'expression au niveau transcriptomique de composés impliqués dans différentes voies de signalisation comme la voie du TGF-β1 et la voie de NF-κB.

Le TGF-β1 est une cytokine pro-fibrosante induisant la synthèse de composants matriciels, notamment le collagène de type I. Les résultats présentés précédemment ont mis en évidence une augmentation de la synthèse des collagènes de type I et III en présence de fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes notamment à la concentration de 1000 µg/ml. Il semble donc intéressant d'analyser les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la voie de signalisation du TGF-β1 en analysant l'expression au niveau transcriptomique de cette cytokine ainsi que celle des SMAD2, 3 et 4 (protéines de signal intracellulaires pour le TGF-β). En effet, les SMAD2/3 après phosphorylation interagissent avec SMAD4 (co-SMAD) et se fixent en amont du promoteur de *COL1A1* permettant la transcription de ce dernier (Chen *et al.*, 1999). L'étude préliminaire est donc double afin d'analyser si, d'une part, les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes modulent ou non la synthèse de TGF-β1 et, d'autre part, si elles ont un effet TGF-β1-like.

NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription qui intervient dans les processus inflammatoires et les événements de réparation tissulaire. C'est un acteur connu de la voie catabolique impliqué dans l'inhibition de la synthèse de collagène de type I, notamment *via* sa sous-unité p65.

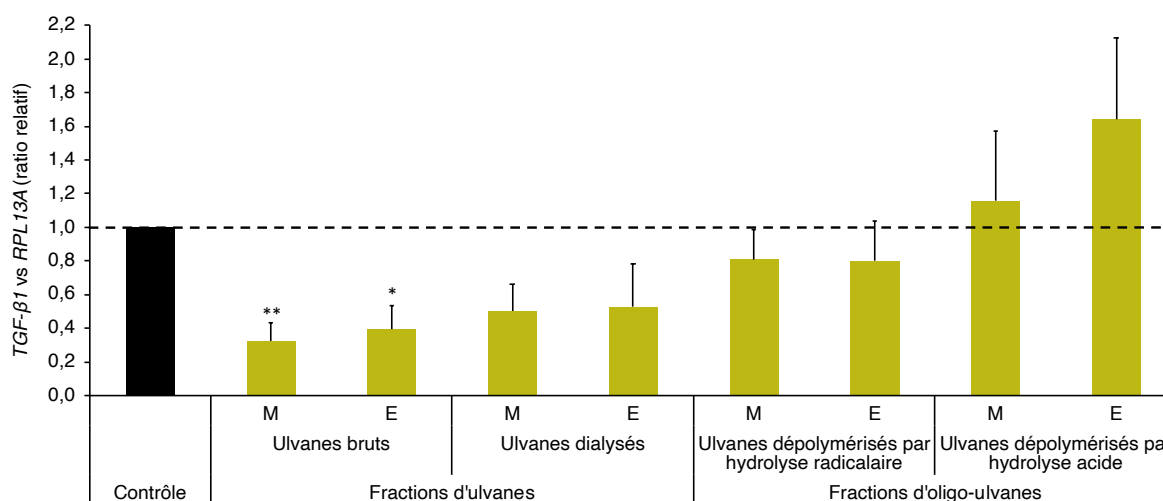
Au vu des précédents résultats concernant la régulation du collagène de type I et de la MMP-1, il était donc intéressant d'analyser les effets potentiels des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues d'*Ulva* sp. sur l'expression de ce facteur de transcription.

## 1. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur le niveau d'expression des ARNm de *TGF- $\beta$ 1*

Le niveau moyen d'expression des ARNm de *TGF- $\beta$ 1* a été évalué après 48 h d'incubation en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à la concentration de 1000  $\mu$ g/ml (Figure 100).

La Figure 100 met en évidence que le niveau moyen d'expression des ARNm de *TGF- $\beta$ 1* est significativement diminué après 48 h d'incubation en présence des ulvanes bruts obtenus par macération ( $p < 0,01$ , facteur 3,1) et EAE ( $p < 0,05$ , facteur 2,5), et non significativement en présence des ulvanes dialysés (facteur 2).

En revanche, le niveau moyen d'expression des ARNm de *TGF- $\beta$ 1* n'est pas significativement modifié en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire (obtenus par macération et EAE) et des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide issus de macération. Cependant, ce niveau moyen d'expression des ARNm de *TGF- $\beta$ 1* est non significativement augmenté en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide issus d'EAE (facteur 1,64).



**Figure 100 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), à la concentration de 1000  $\mu$ g/ml, sur le niveau d'expression des ARNm de *TGF- $\beta$ 1* de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation**

Les niveaux d'expression des ARNm sont normalisés en utilisant le gène *RPL13A* et exprimés en ratio relatif par rapport au contrôle. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student (\* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ ),  $n=4$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 29, 33 et 42 ans).

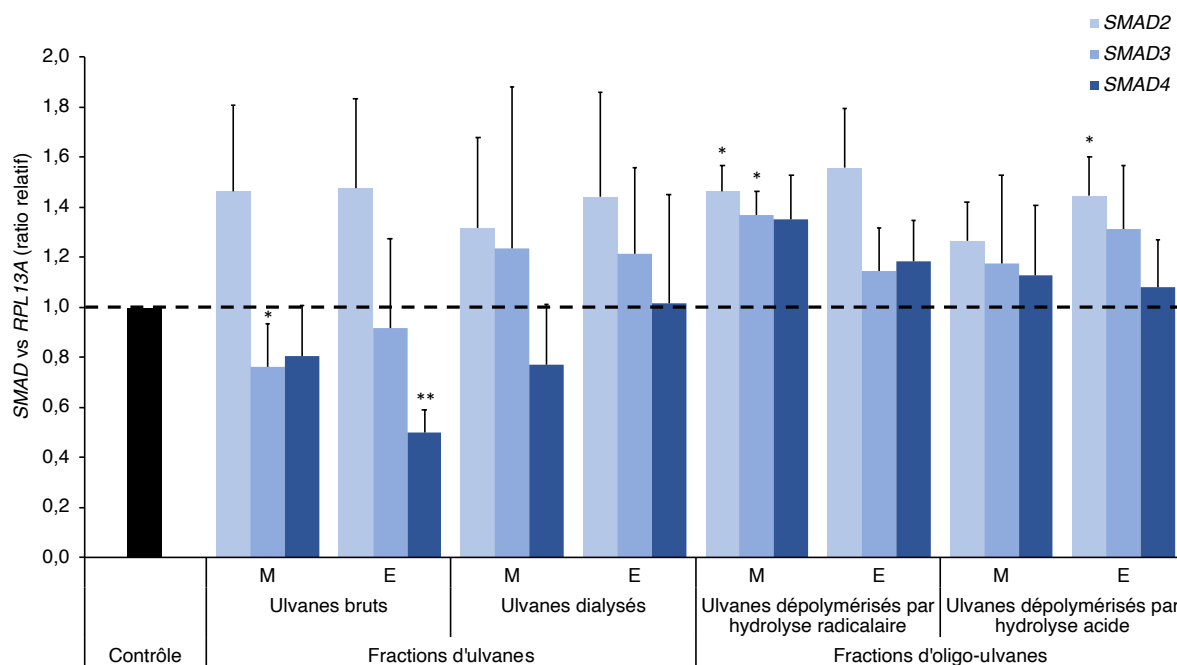
## 2. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur le niveau d'expression des ARNm de *SMAD2*, *SMAD3* et *SMAD4*

La Figure 101 présente l'effet des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à 1000 µg/ml sur les niveaux moyens d'expression des ARNm de *SMAD2/3* et *SMAD4* après 48 h d'incubation.

Les résultats montrent que le niveau moyen d'expression des ARNm de *SMAD2* est significativement ( $p < 0,05$ ) augmenté en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire issus de macération (facteur 1,46) et dépolymérisés par hydrolyse acide issus d'EAE (facteur 1,45), et non significativement en présence des autres fractions (facteur 1,27 à 1,56).

Le niveau moyen d'expression des ARNm de *SMAD3* est augmenté de manière significative ( $p < 0,05$ ) en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire issus de macération (facteur 1,37) et non significative en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide issus d'EAE (facteur 1,31). Une diminution significative ( $p < 0,05$ ) du niveau moyen d'expression des ARNm de *SMAD3* est observée en présence des ulvanes bruts issus de macération (facteur 1,31). Les autres fractions n'impactent pas de manière significative le niveau moyen d'expression des ARNm de *SMAD3*.

Le niveau moyen d'expression des ARNm de *SMAD4* est augmenté de manière non significative en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire (facteur 1,18 et 1,35 pour ceux issus de macération et EAE respectivement) et diminué significativement ( $p < 0,01$ , facteur 2) en présence des ulvanes bruts issus d'EAE. Les autres fractions ne modifient pas de manière significative le niveau moyen d'expression des ARNm de *SMAD4*.



**Figure 101 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), à la concentration de 1000 µg/ml, sur le niveau d'expression des ARNm de *SMAD2*, *SMAD3* et *SMAD4* de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation**

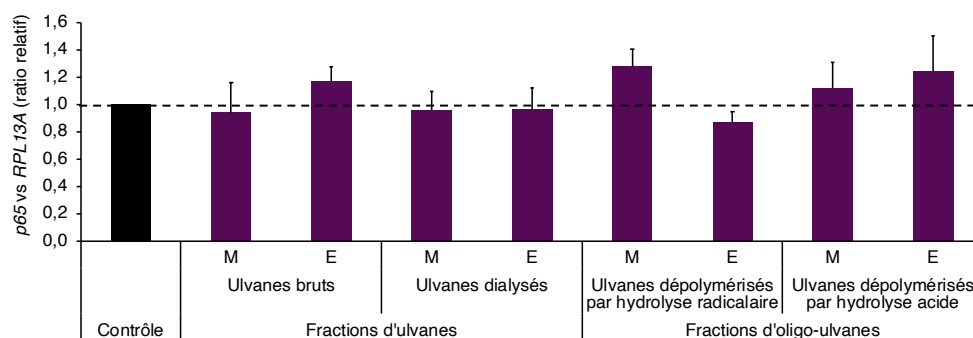
Les niveaux d'expression des ARNm sont normalisés en utilisant le gène *RPL13A* et exprimés en ratio relatif par rapport au contrôle. Les valeurs sont les moyennes ± erreurs standards. La significativité est testée à d'un test *t* de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données (\* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ ),  $n=4$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 29, 33 et 42 ans).



### 3. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur le niveau d'expression des ARNm de la sous-unité *p65* de NF- $\kappa$ B

Le niveau moyen d'expression des ARNm de *p65* a été évalué après 48 h d'incubation en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à la concentration de 1000  $\mu$ g/ml (Figure 102).

Sur la Figure 102, les ulvanes bruts issus d'EAE et les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire issus de macération semblent augmenter le niveau moyen d'expression des ARNm de *p65* mais cette variation n'est pas significative (facteur 1,17 et 1,28 respectivement). À l'inverse, les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire issus d'EAE semblent diminuer le niveau moyen d'expression des ARNm de *p65*, également de façon non significative (facteur 1,1). Les autres fractions ne modifient pas le niveau moyen d'expression des ARNm de *p65*.



**Figure 102 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E), à la concentration de 1000  $\mu$ g/ml, sur le niveau d'expression des ARNm de *p65* de fibroblastes dermiques humains en culture après 48 h d'incubation**

Les niveaux d'expression des ARNm sont normalisés en utilisant le gène *RPL13A* et exprimés en ratio relatif par rapport au contrôle. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student,  $n=4$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 29, 33 et 42 ans).

Les résultats obtenus concernant les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. à la concentration de 1000  $\mu$ g/ml sur l'expression de *TGF- $\beta$ 1*, *SMAD2*, *SMAD3* et *SMAD4*, et la sous-unité *p65* de NF- $\kappa$ B sont résumés dans le Tableau XVII.

Les résultats ont montré que le niveau moyen d'expression des ARNm de *TGF- $\beta$ 1* est diminué en présence des fractions d'ulvanes de façon similaire à la diminution du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* démontrée précédemment. L'analyse au niveau transcriptomique de l'expression des *SMAD* a mis en évidence que le niveau moyen d'expression des ARNm de *SMAD2* est augmenté en présence des différentes fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. Les niveaux moyens d'expression des ARNm de *SMAD3* et *SMAD4* sont diminués en présence des ulvanes bruts obtenus par macération et EAE respectivement. En revanche, en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire le niveau moyen d'expression des ARNm de *SMAD3* et *SMAD4* sont augmentés.

Les résultats ont également mis en évidence que le niveau moyen d'expression des ARNm de la sous-unité *p65* de NF- $\kappa$ B n'est pas significativement modulé en présence des différentes fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes.

De la même façon que précédemment, les conditions opératoires appliquées lors de la première étape d'extraction des ulvanes (par macération ou par EAE) ne semblent pas impacter différemment le niveau moyen d'expression des ARNm de *TGF- $\beta$ 1*, *SMAD2/3* et *SMAD4*, et de la sous-unité *p65* de NF- $\kappa$ B.

Tableau XVII : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E) à la concentration de 1000 µg/ml sur la voie anabolique du TGF-β1 et catabolique de NF-κB des fibroblastes

		Fractions d'ulvanes				Fractions d'oligo-ulvanes			
		Ulvanes bruts		Ulvanes dialysés		Ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire		Ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide	
		M	E	M	E	M	E	M	E
<b>TGF-β1</b>	ARNm <i>TGF-β1</i>	↓**	↓*	↓ns	↓ns	↓ns	=	=	↑ns
<b>SMAD2</b>	ARNm <i>SMAD2</i>	↑ns	↑ns	=	↑ns	↑*	↑ns	↑ns	↑*
<b>SMAD3</b>	ARNm <i>SMAD3</i>	↓*	=	=	=	↑*	=	=	↑ns
<b>SMAD4</b>	ARNm <i>SMAD4</i>	=	↓**	=	=	↑ns	↑ns	=	=
<b>NF-κB</b>	ARNm <i>p65</i>	=	↑ns	=	=	↑ns	↓ns	=	=

↑ : augmentation ; ↓ : diminution ; = : pas de variation ; ns : non significatif ; \* : significatif en considérant  $p < 0,05$  ; \*\* : significatif en considérant  $p < 0,01$ .

### III. Conclusions

Dans ce chapitre, les effets des différentes fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de la macroalgue *Ulva* sp. obtenues par macération ou EAE ont été évalués sur les activités cellulaires de fibroblastes en culture. Ainsi, après 24 h et 48 h d'incubation, la prolifération cellulaire en présence des fractions ainsi que la cytotoxicité potentielle des fractions ont été analysées.

Les résultats obtenus ont montré que les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes n'ont pas d'effet cytotoxique sur les fibroblastes, notamment aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml. De plus, les différentes fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes permettent de stimuler l'activité métabolique des fibroblastes en culture jusque +68% à la concentration de 1000 µg/ml. Néanmoins, ces résultats d'activité métabolique ne permettent pas pour l'instant de discriminer une fraction d'une autre. D'un point de vue pratique, ces premiers travaux sur les activités cellulaires ont permis de définir le temps d'incubation pour lequel les effets biologiques des fractions sont davantage visibles (48 h d'incubation) ainsi que les deux concentrations d'étude intéressantes (50 et 1000 µg/ml). Afin de discriminer les différentes fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes produites, leurs effets sur la synthèse de collagène total ont été analysés. Ces résultats ont permis de sélectionner des fractions de compositions biochimiques différentes et de poids moléculaires différents (ulvanes bruts, dialysés et dépolymérisés) stimulant à la fois l'activité métabolique des fibroblastes et la synthèse de collagène total.

Aussi, lors de ce chapitre, les effets des différentes fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de la macroalgue *Ulva* sp. ont été évalués sur l'expression aux niveaux transcriptomique et protéomique de composants matriciels tels que les collagènes de type I et III, mais aussi sur la synthèse de GAG sulfatés et non sulfatés par des fibroblastes dermiques humains en culture primaire.

Dans ce contexte, le potentiel mécanisme d'action mis en jeu au cours de la modulation de la synthèse collagénique a été recherché de façon préliminaire en s'intéressant à l'expression du niveau moyen des ARNm de *TGF-β1*, *SMAD2/3* et *SMAD4* mais aussi de la sous-unité *p65* de NF-κB.

Les effets potentiels des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la synthèse d'enzymes du catabolisme matriciel comme la MMP-1, connue pour entraîner une diminution de l'expression de la voie anabolique matricielle, ainsi qu'à son inhibiteur, le TIMP-1, ont été investigués.

Les résultats d'activités biologiques *in vitro* sur les fibroblastes en culture ont montré une similitude entre les effets des fractions obtenues par le procédé de macération et de l'EAE (Tableau XVIII, p. 218). Toutefois, l'EAE comme vu au chapitre précédent, présente l'intérêt de produire des rendements d'extraction plus élevés, avec une température d'extraction plus douce en comparaison de la macération. Nos études ont également montré que la majorité des résultats d'activité biologiques *in vitro* sur les fibroblastes présente une réponse dose-dépendante, attestant de l'efficacité de la concentration de 1000 µg/ml. Afin de mettre en parallèle les différents résultats obtenus en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, obtenues par macération et EAE, à la concentration de 1000 µg/ml, sur la synthèse matricielle et le catabolisme matriciel, ceux-ci sont récapitulés dans le Tableau XVIII.

Il a été démontré que les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes entraînent une augmentation de la synthèse de collagène de type I, qui n'est cependant pas corrélée à une augmentation du taux d'ARNm de *COL1A1* et *COL1A2*. En effet, le niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* après 48 h d'incubation est significativement diminué en présence des fractions. L'effet des fractions d'ulvanes sur le niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A2* après 48 h d'incubation est quant à lui plus variable et aucune tendance ne peut être réellement mise en évidence. De plus, les fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et dialysés) induisent une augmentation de la synthèse de collagène de type III, concomitante à une augmentation du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL3A1*. Les fractions d'oligo-ulvanes présentent peu d'effets sur cette synthèse de collagène de type III. En s'intéressant à la synthèse matricielle, il a été mis en évidence que les fractions d'ulvanes entraînent une augmentation de la synthèse de GAG sulfatés et non sulfatés. Toutefois, les fractions d'oligo-ulvanes présentent une perte nette de cette activité stimulatrice de la synthèse de GAG, principalement marquée en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide. Ainsi, cette perte d'activité biologique au niveau de la synthèse matricielle pourrait être corrélée au procédé de dépolymérisation aboutissant à la perte des groupements sulfates ainsi qu'à leur faible poids moléculaire. Il a également été mis en évidence, que les ulvanes dialysés, c'est-à-dire les fractions les plus riches en sucres, acides uroniques et sulfates entraînent une plus forte augmentation de la synthèse de composants de la MEC comme le collagène de type I et les GAG, en comparaison avec les ulvanes bruts.

Par ailleurs, les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes augmentent la synthèse de la MMP-1, aussi bien au niveau protéomique que transcriptomique avec l'augmentation du niveau moyen d'expression des ARNm. De plus, cette augmentation de la synthèse de la MMP-1 est liée à une augmentation de l'activité de collagénase de la MMP-1. En s'intéressant à son inhibiteur respectif, le TIMP-1, seuls les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire ont montré une augmentation significative de son expression au niveau transcriptomique et protéomique. En conséquence, les résultats démontrent que malgré une stimulation du catabolisme matriciel *via* l'augmentation de la MMP-1, la voie anabolique semble être favorisée.

#### Chapitre 4 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de la macroalgue *Ulva* sp. sur le métabolisme matriciel de fibroblastes dermiques humains en culture

---

De plus, l'analyse des effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression de *TGF-β1* a permis de montrer une diminution du niveau moyen d'expression des ARNm de *TGF-β1* notamment en présence des fractions d'ulvanes. Néanmoins, cette diminution n'est pas systématiquement corrélée à une baisse du niveau moyen d'expression des ARNm de *SMAD*. À la vue des résultats de la régulation du collagène de type I, les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression de NF-κB n'ont pas permis de montrer de variation significative du niveau moyen d'expression des ARNm de *p65*. Ainsi, cette voie de signalisation catabolique ne semble pas être régulée par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes au temps d'incubation analysé.

En conclusion, cette partie de notre travail permet de mettre en évidence la présence d'effets biologiques de fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et dialysés) et fractions d'oligo-ulvanes (ulvanes dépolymérisés) issues de l'algue proliférative *Ulva* sp. sur des fibroblastes dermiques humains en culture primaire. Les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes diffèrent sur la voie anabolique/catabolique de la MEC de fibroblastes. Parmi l'ensemble des fractions, les fractions d'ulvanes présentent les effets les plus marqués en comparaison avec les fractions d'oligo-ulvanes. D'un point de vue fondamental, cette partie montre que les effets biologiques observés sur les fibroblastes sont variables en fonction de la composition en ulvanes de la fraction, du degré de sulfatation et du poids moléculaire de celle-ci. Ces résultats suggèrent qu'une fraction enrichie en ulvanes est biologiquement plus active et que la perte de groupements sulfates d'une fraction aboutit à la diminution de certaines activités biologiques.

Tableau XVIII : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération (M) ou EAE (E) à la concentration de 1000 µg/ml sur l'anabolisme et le catabolisme matriciel de fibroblastes

		Fractions d'ulvanes				Fractions d'oligo-ulvanes				
		Ulvanes bruts		Ulvanes dialysés		Ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire		Ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide		
		M	E	M	E	M	E	M	E	
<b>ANABOLISME MATRICIEL</b>										
<b>Collagène de type I</b>	ARNm <i>COL1A1</i>	↓**	↓**	↓**	↓**	↓**	↓**	↓*	↓*	
	ARNm <i>COL1A2</i>	=	↑ns	↓ns	=	=	↓ns	↓ns	↓*	
	Protéine ELISA	↑**	↑*	↑*	↑*	↑ns	↑ns	↑ns	↑ns	
		Western Blot	=	↑ns	↑ns	↑ns	↑ns	=	=	=
<b>Collagène de type III</b>	ARNm <i>COL3A1</i>	↑*	↑*	=	↑*	=	=	↑*	=	
	Protéine Western Blot	↑ns	↑ns	↑ns	↑ns	=	=	=	=	
<b>GAG sulfatés</b>		↑*	↑**	↑**	↑**	↑ns	=	↓ns	=	
<b>GAG non sulfatés</b>		↑**	↑*	↑*	↑*	↑ns	↑ns	↓ns	↓ns	
<b>TIMP-1</b>	ARNm <i>TIMP-1</i>	=	=	=	=	↑*	=	=	=	
	Protéine Western Blot	=	↓ns	=	=	↑*	↑*	↑ns	=	
<b>TGF-β1</b>	ARNm <i>TGF-β1</i>	↓**	↓*	↓ns	↓ns	↓ns	=	=	↑ns	
<b>SMAD2</b>	ARNm <i>SMAD2</i>	↑ns	↑ns	=	↑ns	↑*	↑ns	↑ns	↑*	
<b>SMAD3</b>	ARNm <i>SMAD3</i>	↓*	=	=	=	↑*	=	=	↑ns	
<b>SMAD4</b>	ARNm <i>SMAD4</i>	=	↓**	=	=	↑ns	↑ns	=	=	
<b>CATABOLISME MATRICIEL</b>										
<b>MMP-1</b>	ARNm <i>MMP-1</i>	↑ns	↑*	↑ns	↑ns	↑ns	↑ns	↑*	↑ns	
	Protéine	ELISA	↑**	↑*	↑**	↑*	↑ns	↑ns	↑ns	↑ns
		Western Blot	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↑ns	↑ns	=
		Zymographie	↑*	↑ns	↑ns	↑ns	↑ns	↑ns	↑ns	=
<b>NF-κB</b>	ARNm <i>p65</i>	=	↑ns	=	=	↑ns	↓ns	=	=	

↑ : augmentation ; ↓ : diminution ; = : pas de variation ; ns : non significatif ; \* : significatif en considérant  $p < 0,05$  ; \*\* : significatif en considérant  $p < 0,01$

# **Chapitre 5**

**Effets des fractions d'ulvanes  
et d'oligo-ulvanes issues de la  
macroalgue *Ulva* sp. par EAE  
sur des bactéries du  
microbiote cutané**



# Chapitre 5 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de la macroalgue *Ulva* sp. par EAE sur des bactéries du microbiote cutané

## I. Introduction

Les recherches sur le microbiome et microbiote cutané humain sont relativement récentes et ont commencé dans les années 50 avec Kligman et l'amélioration de la culture cellulaire (Dréno *et al.*, 2016). En 2008, le « National Institutes of Health » aux États-Unis a lancé son programme « Human Microbiome Project » pendant 5 ans avec l'objectif de séquencer les composants du microbiome humain (Oh *et al.*, 2014).

Dans ce contexte de recherches permanentes sur la composition du microbiome cutané, sur les interactions des microorganismes, et sur l'interaction du microbiote avec les cellules cutanées, les effets d'actifs cosmétiques sur le microbiote cutané n'ont été finalement que très peu étudiés à ce jour. Néanmoins, une augmentation des recherches scientifiques sur le microbiote cutané (Alcimed, 2016) a inévitablement conduit à l'émergence d'études dans le domaine cosmétique puisque le microbiote est désormais connu pour son implication dans le maintien d'une barrière cutanée saine.

Le maintien, la protection et la restauration de la diversité et de l'équilibre du microbiote, ainsi que la prévention de dysbioses cutanées sont désormais des allégations émergentes au niveau de l'industrie cosmétique. En effet, les actifs cosmétiques peuvent moduler la microflore bactérienne par inhibition ou, au contraire, par stimulation de la croissance bactérienne et influencer ainsi l'équilibre de l'homéostasie cutanée (Holland & Bojar, 2002). Ces actifs sont susceptibles d'induire ou réprimer des voies métaboliques bactériennes et cellulaires qui peuvent perturber l'homéostasie cutanée. Ainsi, les principales applications identifiées des actifs cosmétiques ciblant des espèces commensales comme *Staphylococcus epidermidis* et *Cutibacterium acnes* sont :

- La promotion du métabolisme commensal et/ou de la diversité bactérienne afin de limiter l'invasion d'agents pathogènes.
- La réduction de la croissance de bactéries pathogènes, de la virulence bactérienne et de la formation de biofilm.
- La modulation du microenvironnement cutané et des réponses du système immunitaire dans le cas de dysbioses cutanées.

Les algues et leur richesse en oligosaccharides sont de potentiels prébiotiques, c'est-à-dire des nutriments bénéfiques sur la santé, et ici pour les bactéries commensales (De Jesus Raposo *et al.*, 2016).



Des études récentes ont montré que des actifs cosmétiques composés d'extraits algaux étaient capables de rétablir un microbiome sain et de renforcer la diversité microbienne suite à une dysbiose liée au stress (Morvan & Vallee, 2018) ou d'augmenter la diversité bactérienne et notamment le niveau de *S. epidermidis* de peaux réactives et sensibles (Filaire *et al.*, 2019a).

Aussi, après s'être intéressé à l'effet des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur le métabolisme matriciel des fibroblastes dermiques humains, leur potentiel impact sur le microbiote cutané a été évalué. Pour cela, trois bactéries cutanées, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Cutibacterium acnes*, ayant un rôle prépondérant dans ce microbiote cutané de par leur caractère commensal et potentiellement pathogène opportuniste selon les conditions de l'environnement cutané, ont été sélectionnées (Aryee & Edgeworth, 2017 ; Fournière *et al.*, 2020).

En effet, dans le follicule pileux, *S. aureus* et *C. acnes* sont associés et participent à un microbiote cutané sain (Frenard *et al.*, 2018). Toutefois, *S. aureus* peut également se comporter comme un pathogène opportuniste (Liu *et al.*, 2018). Une étude suggère que *C. acnes* participerait à la colonisation cutanée par *S. aureus* en condition anaérobie et à la formation de biofilm de *S. aureus* (Tyner & Patel, 2016). Les souches *C. acnes* du phylotype IA1 et, plus particulièrement, les souches acnéiques (souches de ribotypes RT4 ou RT5) sont porteuses d'un plasmide de virulence associé aux formes les plus sévères de la pathologie de l'acné (McDowell *et al.*, 2005 ; Fitz-Gibbon *et al.*, 2013 ; Dagnelie *et al.*, 2018). Par ailleurs, les biofilms de *C. acnes*, à l'intérieur des glandes sébacées, sont considérés parmi les principales causes possibles de l'acné, d'autant que ceux-ci leurs confèrent une haute résistance aux agents antimicrobiens et à l'action du système immunitaire de l'hôte (Coenye *et al.*, 2007 ; Achermann *et al.*, 2014). Plus récemment, la bactérie commensale *S. epidermidis* a été présentée comme un nouvel acteur potentiel dans la physiopathologie de l'acné *via* sa capacité à limiter la colonisation par *C. acnes* (Claudel *et al.*, 2019). Ainsi, la promotion de la croissance de *S. epidermidis* serait intéressante dans le cas de la prévention de l'acné.

Dans cette étude, réalisée lors d'une mobilité de 3 mois, les effets de fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et dialysés) et d'oligo-ulvanes (ulvanes dépolymérisés) issues de la macroalgue *Ulva* sp. par EAE, ont été évalués sur quatre souches bactériennes d'origine cutanée humaine : *Staphylococcus epidermidis* MFP04, *Staphylococcus aureus* MFP03, et deux souches de *Cutibacterium acnes*, une souche acnéique et une non acnéique. Les deux souches de *C. acnes* utilisées sont : la souche HL045PA1/HM-516, de phylotype IA<sub>1</sub> et de ribotype 4 (RT4) dite « acnéique » et la souche HL110PA3/HM-554, de phylotype II et de ribotype 6 (RT6) dite « non acnéique ».

Ce chapitre de notre étude consiste donc à analyser les effets potentiels de fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la croissance bactérienne, la formation de biofilm, et le potentiel cytotoxique ou inflammatoire des souches bactériennes sur les kératinocytes HaCaT.

Ce travail a permis de répondre à différentes questions :

- Les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes modulent-elles le métabolisme de ces bactéries cutanées ?

- Quels sont les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la formation de biofilm de *S. epidermidis* MFP04, *S. aureus* MFP03, et *C. acnes* RT4 et RT6 ?
- Les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes modulent-elles la virulence bactérienne des staphylocoques sur les kératinocytes ?
- Le potentiel inflammatoire des souches acnéique et non acnéique de *C. acnes* sur les kératinocytes, est-il modifié par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes ?
- Les fractions d'oligo-ulvanes présentent-elles des activités biologiques différentes des fractions d'ulvanes sur ces bactéries ?

## II. Résultats

### A. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la croissance bactérienne

#### 1. Effets sur la croissance de staphylocoques commensaux cutanés : *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03

Les croissances de *S. epidermidis* MFP04 (Figure 103) et *S. aureus* MFP03 (Figure 104) ont été étudiées en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE, à la concentration de 1000 µg/ml.

Les Figures 103 et 104 mettent respectivement en évidence que les croissances des souches *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03 ne sont pas modifiées en présence des fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et dialysés) et d'oligo-ulvanes (ulvanes dépolymérisés). En effet, aucun effet des fractions sur la croissance bactérienne n'est mis en évidence au niveau des différentes phases de croissance : phase exponentielle où le temps de génération est calculé (Figure 105) et phase stationnaire (biomasse finale).

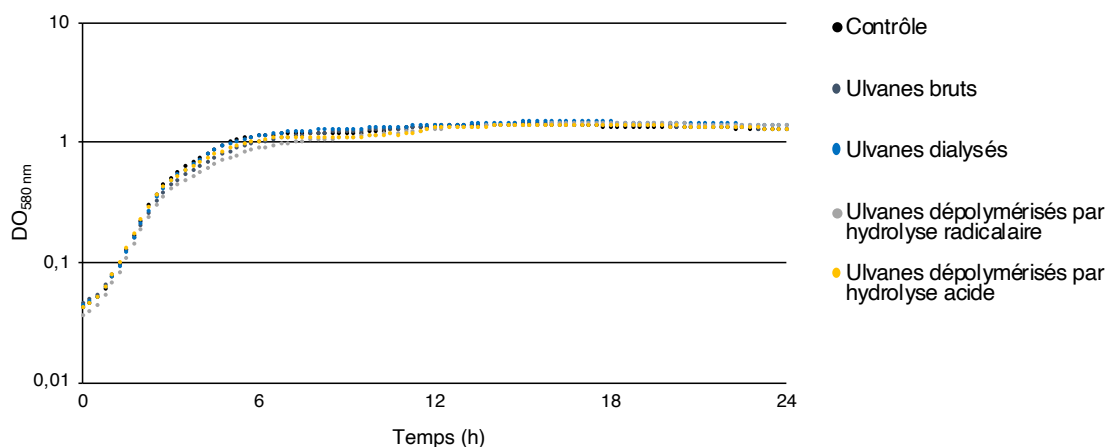
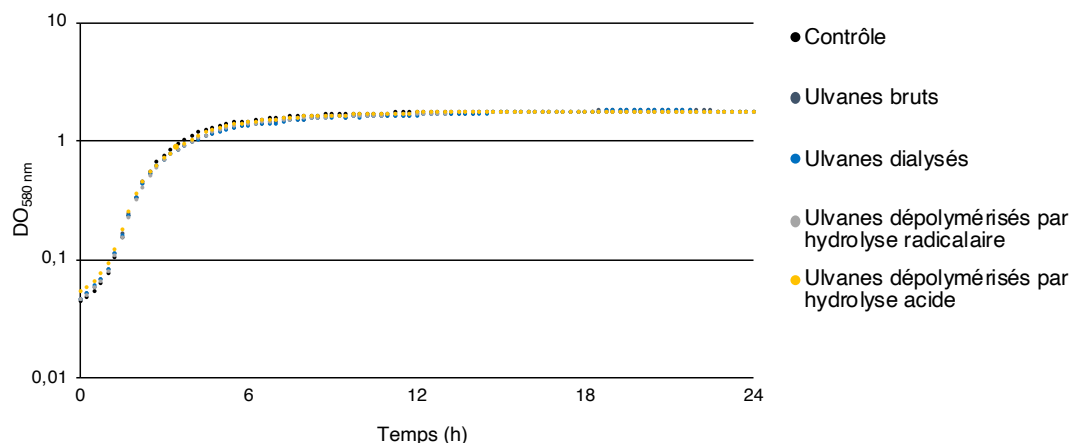


Figure 103 : Cinétiques de croissance de *S. epidermidis* MFP04 en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml

Les courbes sont les moyennes de trois expériences ( $n=3$ ). Les erreurs standards calculées étant faibles, celles-ci ne sont pas représentées dans la représentation en échelle  $\log_{10}$ . Le contrôle correspond à la croissance bactérienne en milieu de culture seul, ici le TSB.

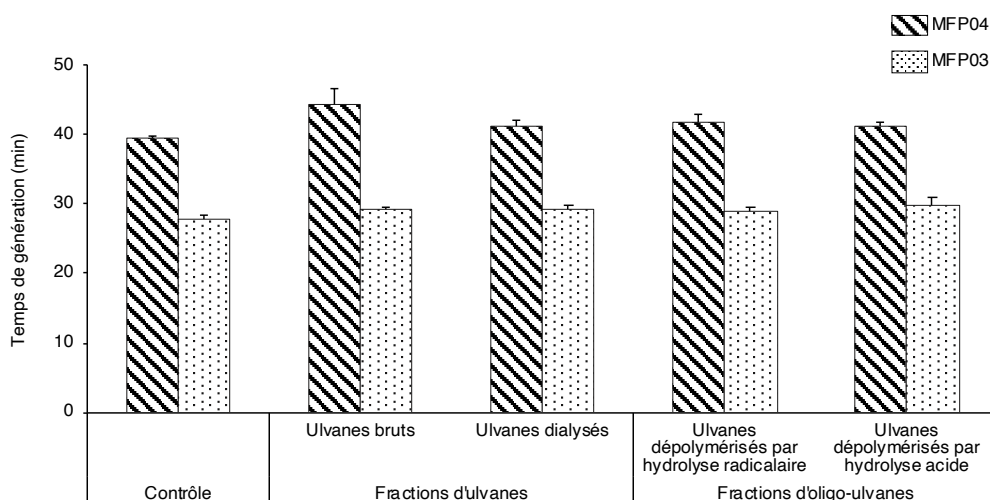


**Figure 104 : Cinétiques de croissance de *S. aureus* MFP03 en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml**

Les courbes sont les moyennes de trois expériences ( $n=3$ ). Les erreurs standards calculées étant faibles, celles-ci ne sont pas représentées dans la représentation en échelle  $\log_{10}$ . Le contrôle correspond à la croissance bactérienne en milieu de culture seul, ici le TSB.

Comme évoqué précédemment, les temps de génération (temps nécessaire au doublement du nombre de bactéries) des deux souches ont été déterminés pour chaque réplicat biologique (Figure 105).

Le temps de génération de *S. epidermidis* MFP04 en milieu TSB est de 40 min en moyenne ( $n=3$ ) et celui-ci est statistiquement inchangé en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. De même, le temps de génération de *S. aureus* MFP03 en milieu TSB est de 28 min en moyenne ( $n=3$ ) et celui-ci est statistiquement inchangé en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes.



**Figure 105 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml sur le temps de génération de *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03**

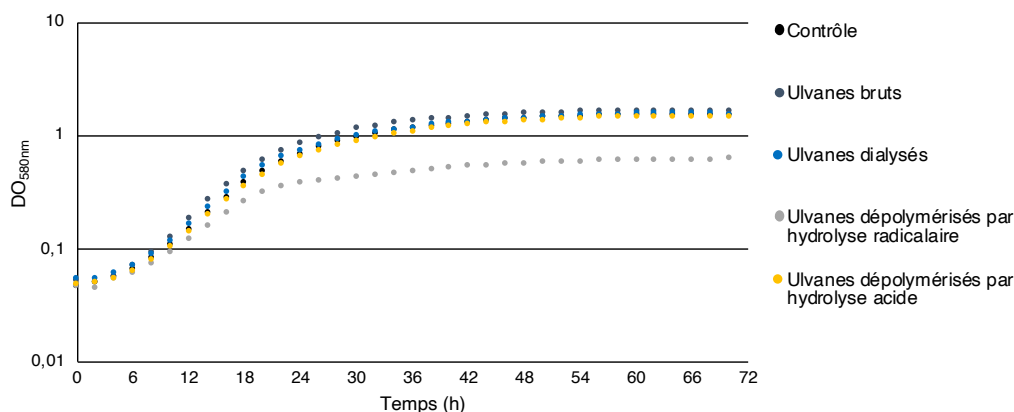
Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreur standard. La significativité est testée à l'aide d'un test  $t$  de Student,  $n=3$ .

Les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues d'*Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml n'affectent donc pas les croissances bactériennes de ces deux staphylocoques commensaux, *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03, issus de peau humaine saine. Cette concentration de 1000 µg/ml est donc conservée pour les expérimentations suivantes sur ces souches.

## 2. Effets sur la croissance de souches *C. acnes* RT4 et RT6

Les croissances bactériennes de la souche acnéique *C. acnes* RT4 (Figure 106) et de la souche non acnéique *C. acnes* RT6 (Figure 107), ont été étudiées en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issus de l'algue *Ulva* sp. par EAE, à la concentration de 1000 µg/ml.

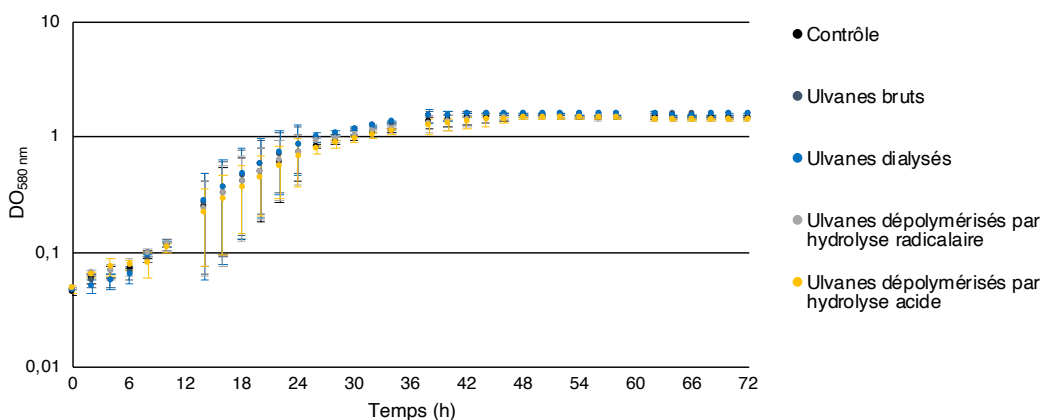
La croissance bactérienne de *C. acnes* RT4 n'est pas modifiée en présence des ulvanes bruts, dialysés et dépolymérisés par hydrolyse acide (Figure 106) en considérant à la fois la phase exponentielle (temps de génération) et la phase stationnaire (biomasse finale). Cependant, les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire diminuent la phase stationnaire de la souche RT4. La biomasse finale de la souche RT4 est réduite en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire d'un facteur 2.



**Figure 106 : Cinétiques de croissance de *C. acnes* RT4 en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml**

Les courbes sont les moyennes des expérimentations ( $n=3$ ). Les erreurs standards calculées étant faibles, celles-ci ne sont pas représentées dans la représentation en échelle  $\log_{10}$ . Le contrôle correspond à la croissance bactérienne en milieu de culture seul, ici RCM PAstone (RCM PA).

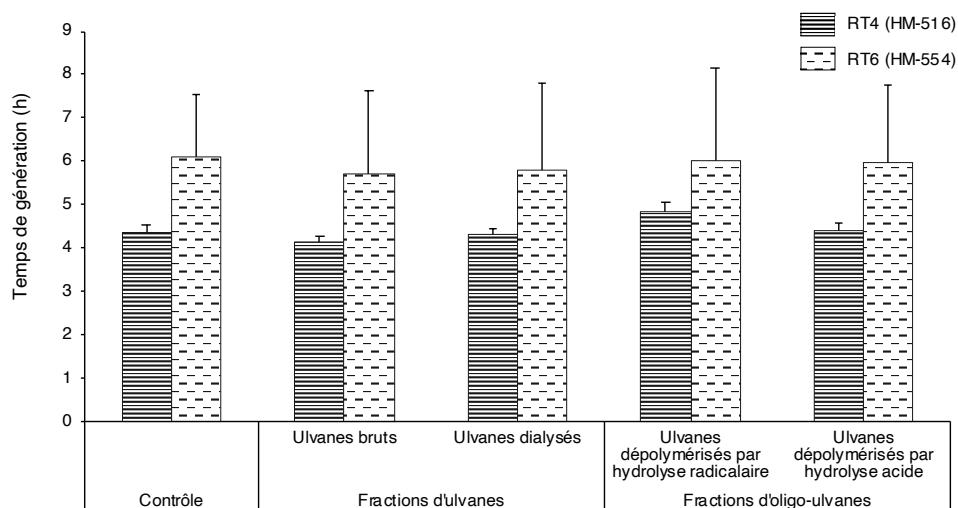
La Figure 107 met également en évidence que la croissance bactérienne de *C. acnes* RT6 ne semble pas modifiée en présence de toutes les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes en considérant à la fois la phase exponentielle (temps de génération) et la phase stationnaire (biomasse finale). Néanmoins, ce résultat est basé uniquement sur un duplicat d'expérimentations et n'est donc pas statistiquement vérifié.



**Figure 107 : Cinétiques de croissance de *C. acnes* RT6 en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml**

Les courbes sont les moyennes de deux expériences pour chaque condition testée ( $n=2$ ). Les erreurs standards sont ici représentées dans la représentation en échelle  $\log_{10}$ . Le contrôle correspond à la croissance bactérienne en milieu de culture seul, ici RCM PolyPeptone (RCM PP).

La Figure 108 met en évidence les temps de génération des deux souches *C. acnes* RT4 et RT6 en présence ou l'absence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. Les temps moyens de génération des deux souches non traitées sont de  $4,38 \pm 0,29$  heures pour RT4 et  $6,10 \pm 1,45$  h pour RT6. Aucune différence significative sur les temps de génération de la souche RT4 n'est observable entre le contrôle et l'exposition aux fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. En ce qui concerne la souche RT6, cela n'est pas statistiquement vérifié ( $n=2$ ).



**Figure 108 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$  sur le temps de génération de *C. acnes* RT4 et RT6**

Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreur standard ( $n=5$  pour RT4 et  $n=2$  pour RT6). La significativité pour RT4 est testée à l'aide d'un test *t* de Student.

Les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$  n'affectent donc pas la croissance bactérienne de la souche acnéique *C. acnes* RT4 ni le temps de génération de la souche non acnéique RT6. Aussi, cette concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$  est donc conservée pour les expérimentations suivantes de l'étude des effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur ces souches.

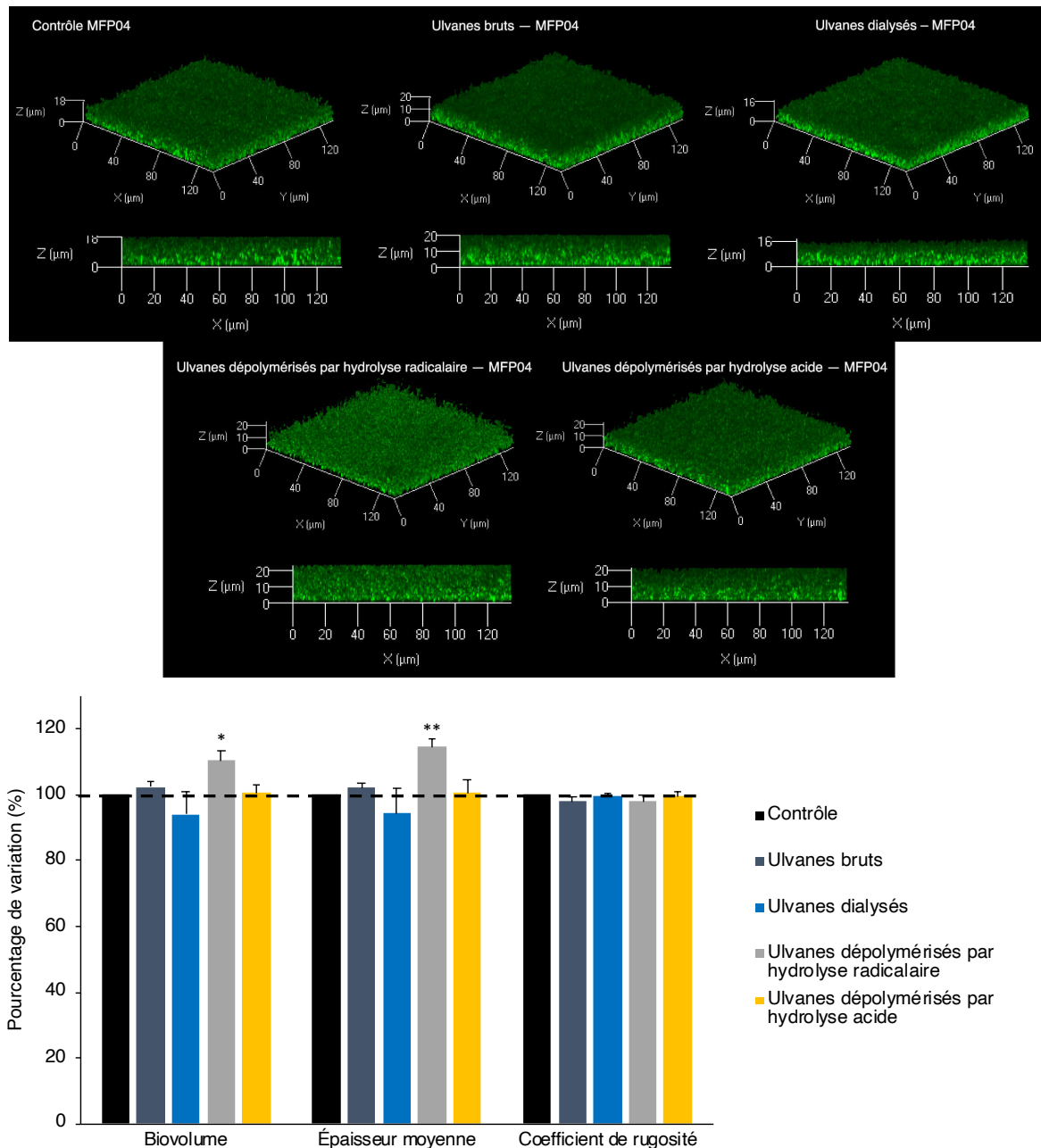
## B. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la formation de biofilm par *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03

Les structures des biofilms formés par *S. epidermidis* MFP04 (Figure 109) et *S. aureus* MFP03 (Figure 110), préalablement cultivés en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à la concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , ont été évaluées après 48 h d'incubation, en culture statique, par microscopie confocale à balayage laser. L'étude des biofilms est réalisée par les analyses des facteurs suivants à l'aide du logiciel COMSTAT2 :

- Le biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) fournit une estimation de la biomasse dans le biofilm.
- L'épaisseur moyenne du biofilm ( $\mu\text{m}$ ) ignore la présence de pore dans le biofilm.
- Le coefficient du rugosité (Ra) fournit une mesure de la variation de l'épaisseur du biofilm et est un indicateur de l'hétérogénéité du biofilm (Heydorn *et al.*, 2000).

Les expérimentations ont été réalisées sur quatre réplicats biologiques.

Un biofilm mature de *S. epidermidis* MFP04 d'épaisseur moyenne de  $7,06 \pm 0,58 \mu\text{m}$  et de biovolume de  $4,57 \pm 0,41 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  a été observé dans la condition de contrôle après incubation (sans traitement avec les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes) (Figure 109).



**Figure 109 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml sur la capacité de formation de biofilm de *S. epidermidis* MFP04, évalués par microscopie confocale à balayage laser**

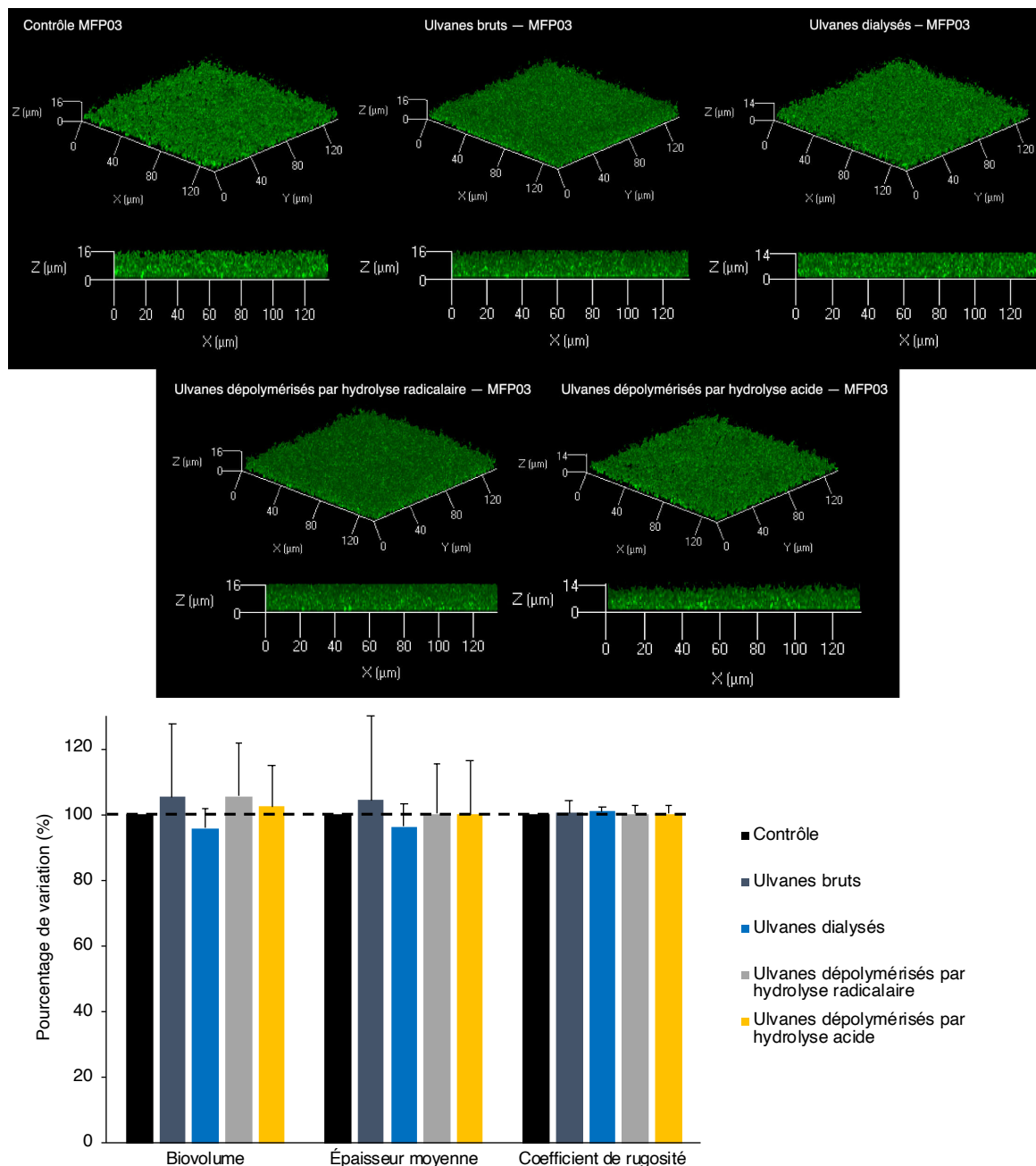
Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données,  $n=4$ .

Les vues horizontales et transversales X/Z-X/Y/Z représentatives des conditions testées sur la formation de biofilm de MFP04 sont présentées au-dessus du graphique.

La Figure 109 met en évidence que les ulvanes bruts, dialysés et dépolymérisés par hydrolyse acide n'induisent pas de modifications significatives de la structure du biofilm formé par *S. epidermidis* MFP04, en considérant son biovolume, son épaisseur moyenne et son coefficient de rugosité.

Toutefois, les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire induisent une augmentation significative du biovolume du biofilm de *S. epidermidis* MFP04 (+10,6%,  $p < 0,05$ ) ainsi que de son épaisseur moyenne (+14,7%,  $p < 0,01$ ).

De la même manière, un biofilm mature de *S. aureus* MFP03 d'épaisseur moyenne de  $4,54 \pm 0,53 \mu\text{m}$  et de biovolume de  $3,37 \pm 0,81 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  a été observé dans la condition de contrôle après incubation (sans traitement avec les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes) (Figure 110).



**Figure 110 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de  $1000 \mu\text{g/ml}$  sur la capacité de formation de biofilm de *S. aureus* MFP03, évalués par microscopie confocale à balayage laser**

Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test  $t$  de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données,  $n=4$ .

Les vues horizontales et transversales X/Z-X/Y/Z représentatives des conditions testées sur la formation de biofilm de MFP03 sont présentées au-dessus du graphique.



L'effet des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la structure de biofilm formé par *S. aureus* MFP03 est similaire à celui observé pour *S. epidermidis* MFP04. En effet, la Figure 110 met en évidence que les fractions d'ulvanes n'induisent pas de modifications significatives de la structure du biofilm formé par *S. aureus* MFP03.

Les ulvanes bruts, dialysés et dépolymérisés par hydrolyse acide issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml n'affectent donc pas la structure des biofilms des staphylocoques cutanés *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03. Seuls les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire augmentent le biovolume et l'épaisseur moyenne du biofilm formé par *S. epidermidis* MFP04.

### C. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la formation de biofilm par *C. acnes* RT4 et RT6

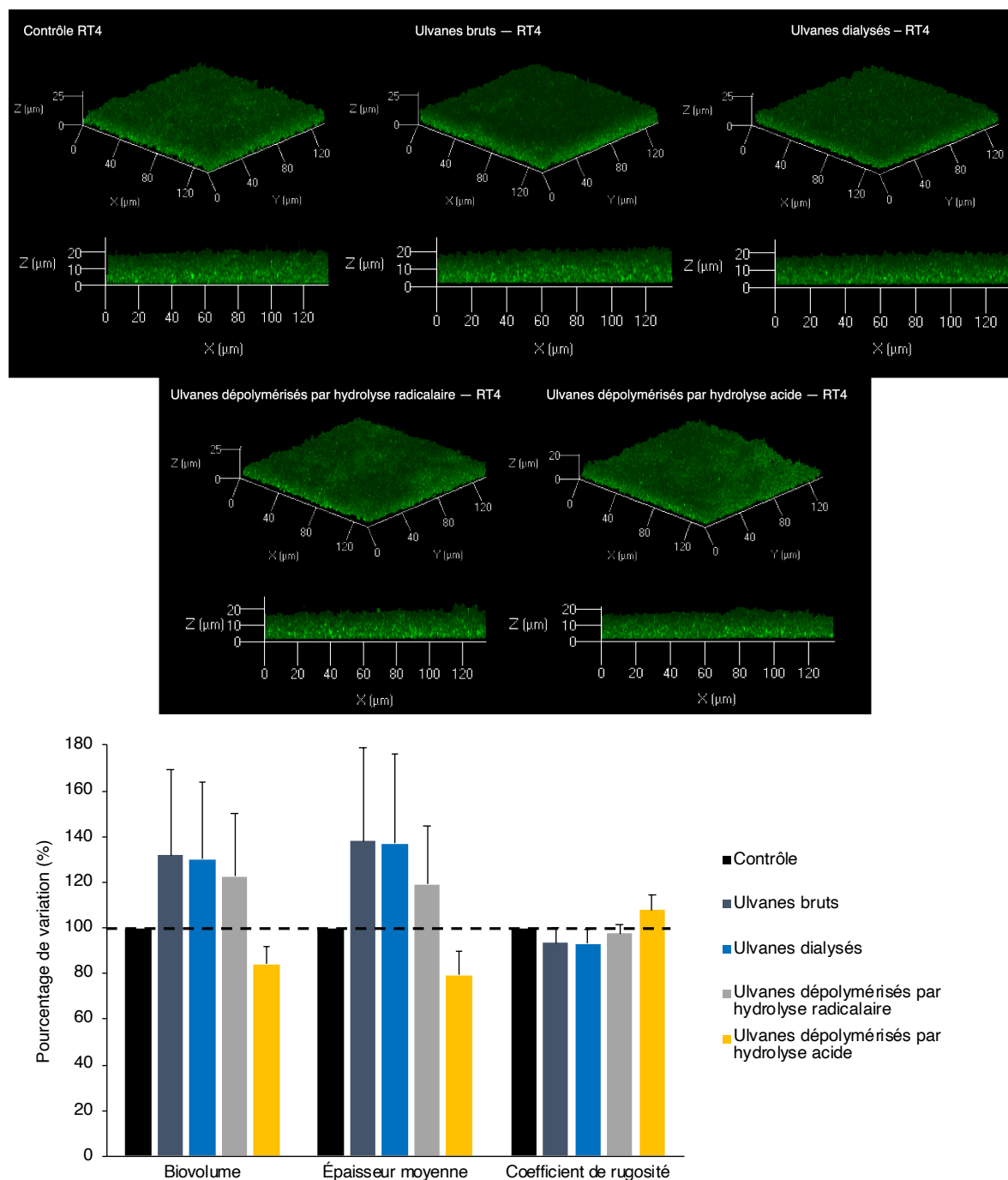
---

Les structures des biofilms formés par *C. acnes* RT4 (souche acnéique) et RT6 (souche non acnéique), préalablement cultivées en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de la macroalgue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml, ont été évaluées après 72 h d'incubation, en culture statique, par microscopie confocale à balayage laser (Figures 111 et 112 respectivement).

L'étude des biofilms est réalisée par l'analyse du biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ), de l'épaisseur moyenne ( $\mu\text{m}$ ) et du coefficient de rugosité (Ra). Les expérimentations ont été réalisées sur quatre réplicats biologiques.

La Figure 111 (page suivante) met en évidence que les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide induisent une diminution de manière non significative à la fois du biovolume (-16%) et de l'épaisseur moyenne (-21%) du biofilm de *C. acnes* RT4. Les autres fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes n'induisent pas de modifications significatives de la structure du biofilm de *C. acnes* RT4 d'épaisseur moyenne de  $9,52 \pm 1,83 \mu\text{m}$  et de biovolume  $5,93 \pm 1,04 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ .



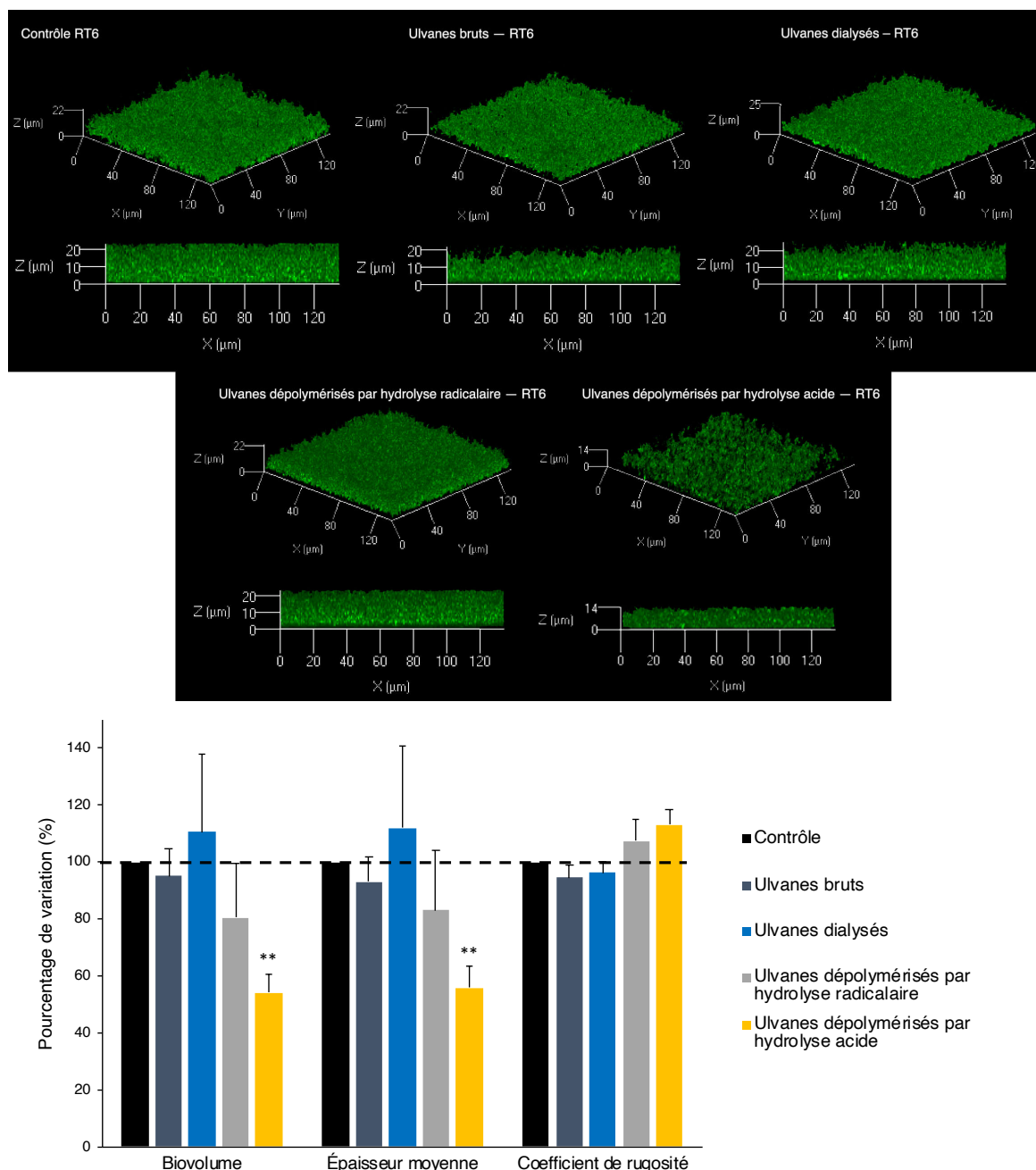


**Figure 111 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml sur la capacité de formation de biofilm de *C. acnes* RT4, évalués par microscopie confocale à balayage laser**

Les valeurs sont les moyennes ± erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données,  $n=4$ .

Les vues horizontales et transversales X/Z-X/Y/Z représentatives des conditions testées sur la formation de biofilm de *C. acnes* RT4 sont présentées au-dessus du graphique.

La Figure 112 montre que les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide induisent une diminution significative ( $p < 0,01$ ) du biovolume (-46%) et de l'épaisseur moyenne (-44%) du biofilm de *C. acnes* RT6. Les autres fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes ne modifient pas significativement la structure du biofilm de *C. acnes* RT6 (épaisseur moyenne de  $5,17 \pm 1,27 \mu\text{m}$  et de biovolume  $3,44 \pm 0,87 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ).



**Figure 112 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml sur la capacité de formation de biofilm de *C. acnes* RT6, évalués par microscopie confocale à balayage laser**

Les valeurs sont les moyennes ± erreurs standards. La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données (\*\* :  $p < 0,01$ ),  $n=4$ .

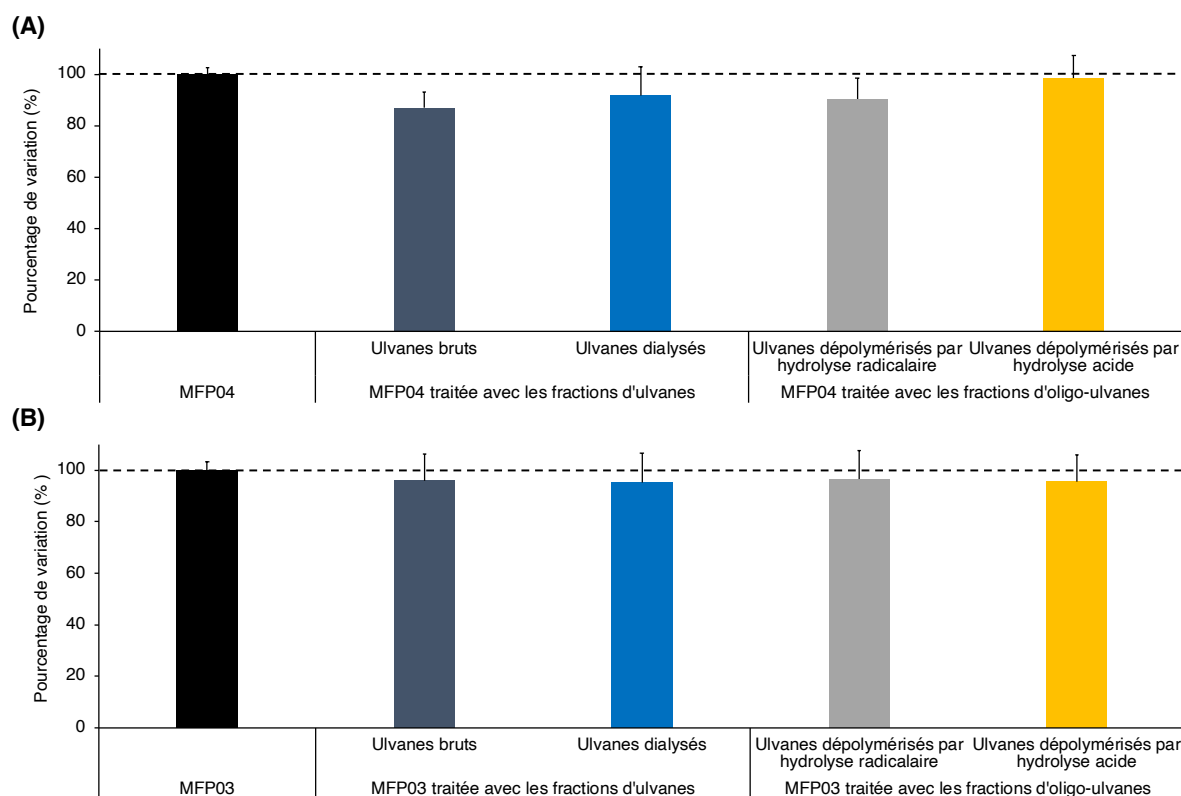
Les vues horizontales et transversales X/Z-X/Y/Z représentatives des conditions testées sur la formation de biofilm de *C. acnes* RT6 sont présentées au-dessus du graphique.

Les ulvanes bruts, dialysés et dépolymérisés par hydrolyse radicalaire issus de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml n'affectent pas la structure des biofilms des souches *C. acnes* RT4 et RT6 de *C. acnes*. À l'inverse, les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide issus de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml affectent la structure des biofilms des souches *C. acnes* RT4 et RT6 en diminuant l'épaisseur moyenne et le biovolume de celui-ci (baisse uniquement significative dans le cas de la souche RT6,  $p < 0,01$ ).

## D. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'activité cytotoxique de *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03 sur les kératinocytes

Les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'activité cytotoxique des souches *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03 sur les kératinocytes HaCaT ont été évalués par le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH). Les bactéries ont été préalablement cultivées en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à la concentration de 1000 µg/ml. Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport au contrôle infecté par la souche *S. epidermidis* MFP04 (Figure 113A) et la souche *S. aureus* MFP03 (Figure 113B).

La Figure 113A montre que les ulvanes bruts diminuent non significativement (-13%) le potentiel cytotoxique de *S. epidermidis* MFP04. En présence des autres fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, son potentiel cytotoxique sur les kératinocytes n'est pas significativement modifié. Les différentes fractions d'ulvanes testées n'ont pas d'effet significatif sur le potentiel cytotoxique de *S. aureus* MFP03 (Figure 113B).



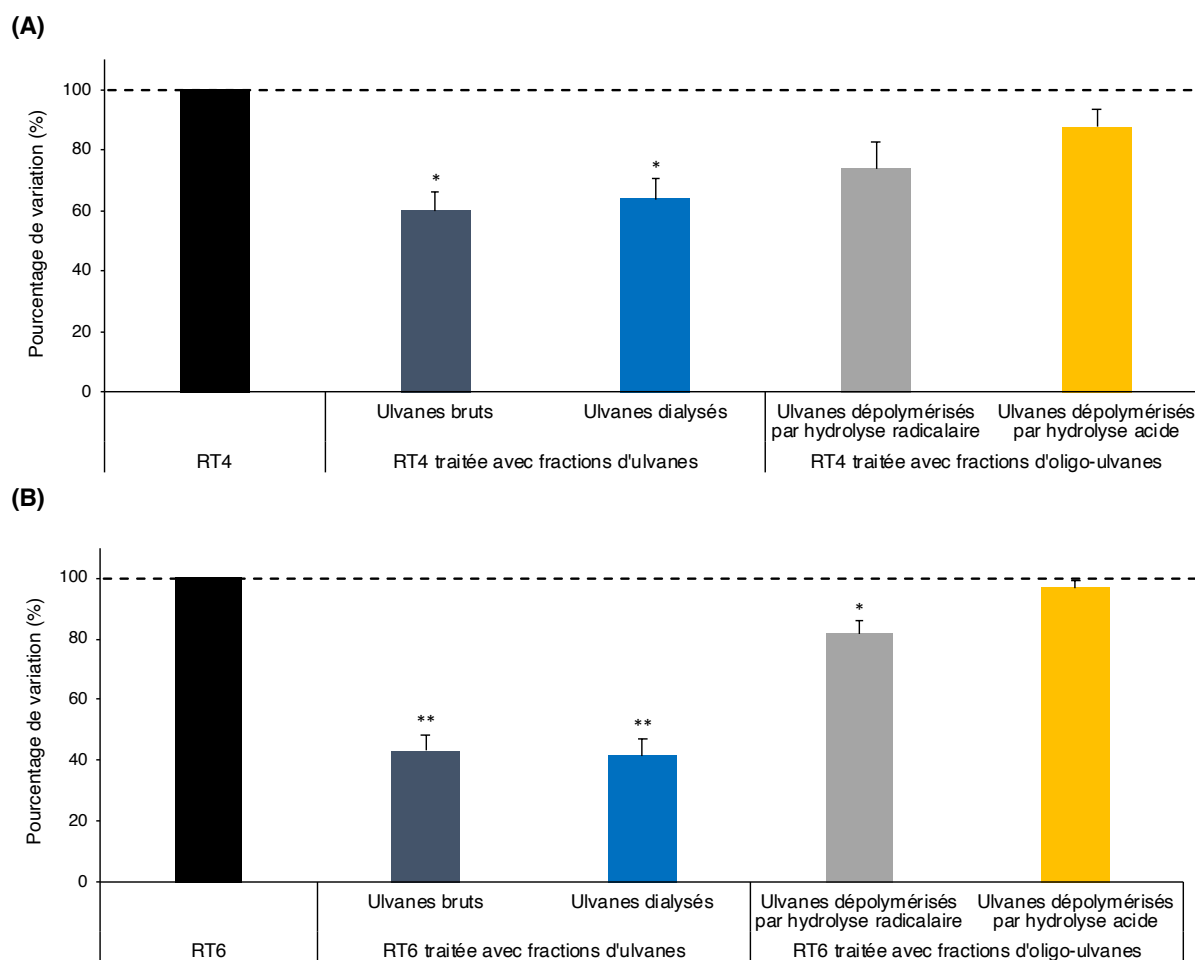
**Figure 113 : Activités cytotoxiques de (A) *S. epidermidis* MFP04 et (B) *S. aureus* MFP03 sur les kératinocytes HaCaT après exposition aux fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml (16 h, MOI 10), évaluées par dosage de la LDH**  
Les valeurs sont les moyennes ± erreurs standards ( $n=3$ ). La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student ou Mann-Whitney selon la distribution des données.

Les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à la concentration de 1000 µg/ml ne modifient pas de manière significative le potentiel cytotoxique des souches *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03 sur les kératinocytes.

## E. Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la réponse inflammatoire des kératinocytes induite par *C. acnes* RT4 et RT6

Le potentiel inflammatoire des kératinocytes induit par les souches *C. acnes* RT4 et RT6, préalablement cultivées avec les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, a été évalué *via* le dosage de l'interleukine-8 (IL-8), cytokine majoritairement utilisée dans l'évaluation de l'inflammation. Les résultats de libération d'IL-8 sont exprimés en pourcentage de variation par rapport au contrôle infecté par la souche acnéique RT4 (Figure 114A) et non acnéique RT6 (Figure 114B).

Le niveau de libération basal d'IL-8 par les cellules non infectées a été estimé à  $1,82 \pm 0,28$  pg/ml. Les kératinocytes infectés par la souche acnéique RT4 présentent un niveau de libération d'IL-8 de  $1051,17 \pm 283,50$  pg/ml et ceux infectés par la souche non acnéique RT6 un niveau de  $801,63 \pm 203,31$  pg/ml. Le niveau de libération d'IL-8 par les kératinocytes est donc plus important après infection en présence de la souche acnéique RT4 que de la souche non acnéique RT6.



**Figure 114 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml sur le potentiel inflammatoire de *C. acnes* (A) RT4 et (B) RT6, mesurés par dosage d'IL-8 libérée par les kératinocytes HaCaT (18 h, MOI 50)**

Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreurs standards ( $n=3$ ). La significativité est testée à l'aide d'un test *t* de Student (\*\* :  $p < 0,01$  et \* :  $p < 0,05$ ).

La Figure 114A met en évidence que la libération d'IL-8 par les kératinocytes, induite par la souche acnéique RT4, est significativement diminuée ( $p < 0,05$ , -39,82% et -36,05%) après culture de la souche en présence des ulvanes bruts et dialysés respectivement (fractions d'ulvanes). Aussi, les fractions d'oligo-ulvanes induisent une diminution de la libération d'IL-8, et donc le potentiel inflammatoire de la souche acnéique RT4 sur les kératinocytes mais de manière non significative (-25,85% et -12,14% après culture bactérienne en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire et acide respectivement).

La Figure 114B montre que la libération d'IL-8 par les kératinocytes, induite par la souche non acnéique RT6, est significativement diminuée ( $p < 0,01$ , -56,95% et -58,33%) après culture de la souche en présence des ulvanes bruts et dialysés respectivement (fractions d'ulvanes). De plus, les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire permettent également de réduire significativement ( $p < 0,05$ , -18,26%) la libération d'IL-8 et donc le potentiel inflammatoire de la souche non acnéique RT6 sur les kératinocytes. Les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide induisent une faible diminution, non significative, de la libération d'IL-8 et donc du potentiel inflammatoire de la souche RT6 sur les kératinocytes (-3,26%).

Les fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et dialysés) à la concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$  induisent une diminution de manière significative du potentiel inflammatoire des souches acnéique RT4 ( $p < 0,05$ ) et non acnéique RT6 ( $p < 0,01$ ) de *C. acnes* sur les kératinocytes. Les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire à la concentration de 1000  $\mu\text{g/ml}$  diminuent significativement ( $p < 0,05$ ) le potentiel inflammatoire de la souche non acnéique RT6. Les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide abaissent faiblement et non significativement le potentiel inflammatoire des deux souches de *C. acnes*. Cette perte d'activité biologique de ces fractions d'oligo-ulvanes au niveau de la diminution du potentiel inflammatoire des souches acnéique et non acnéique de *C. acnes* pourrait à nouveau être corrélée au procédé de dépolymérisation aboutissant à la perte des groupements sulfates ainsi qu'à leur faible poids moléculaire.

### III. Conclusions

Dans cette étude, les effets des fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et dialysés) et d'oligo-ulvanes (ulvanes dépolymérisés) issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE ont été évalués sur quatre souches bactériennes d'origine cutanée : *S. epidermidis* MFP04, *S. aureus* MFP03, et *C. acnes* RT4 (HM-516) et RT6 (HM-516). Leurs effets sur la croissance (temps de génération et biomasse finale), sur la formation de biofilm *via* l'analyse de leur structure, et sur le potentiel cytotoxique ou inflammatoire sur les kératinocytes HaCaT, ont été analysés.

Afin de mettre en parallèle les différents résultats obtenus en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml sur la virulence bactérienne, ceux-ci sont récapitulés dans le Tableau XIX (p. 236).

Les résultats obtenus ont montré que les fractions d'ulvanes n'ont ni d'effet sur la croissance ni sur la structure des biofilms des quatre souches. Les fractions d'ulvanes permettent néanmoins de diminuer significativement le potentiel inflammatoire des deux souches de *C. acnes* ( $p < 0,05$  pour la souche acnéique et  $p < 0,01$  pour la non acnéique).

Aussi, les fractions d'oligo-ulvanes n'ont aucun impact sur le temps de génération des quatre souches. Toutefois, les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire augmentent significativement le biovolume et l'épaisseur moyenne du biofilm de *S. epidermidis* MFP04 et diminuent la biomasse finale de la souche acnéique *C. acnes* RT4.

Les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire permettent également de réduire le potentiel inflammatoire des deux souches de *C. acnes* (non significatif pour RT4 et significatif,  $p < 0,05$ , pour RT6). Seuls les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide permettent une diminution de la formation de biofilm de *C. acnes*, avec une baisse non significative pour RT4 et significative ( $p < 0,01$ ) pour RT6. De plus, les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide diminuent, non significativement, le potentiel inflammatoire des deux souches de *C. acnes*.

De manière générale, aucune des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes ne modifie significativement le potentiel cytotoxique de *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03 sur les kératinocytes.

En conclusion, ces expériences permettent de mettre en évidence la présence d'effets biologiques de fractions d'ulvanes polysaccharidiques (ulvanes bruts et dialysés) et d'oligo-ulvanes (ulvanes dépolymérisés) issues de l'algue proliférative *Ulva* sp. sur le microbiote cutané et, notamment, sur les souches acnéique et non acnéique de *Cutibacterium acnes*. D'un point de vue fondamental, cette partie montre que les effets biologiques observés sur les souches de *C. acnes* sont variables en fonction de la composition en ulvanes de la fraction, du degré de sulfatation et du poids moléculaire de celle-ci. Ces résultats suggèrent à nouveau que la perte de groupements sulfates d'une fraction aboutit à la modification de certaines activités biologiques.

Tableau XIX : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par EAE à la concentration de 1000 µg/ml sur les bactéries cutanées *S. epidermidis* MFP04, *S. aureus* MFP03, *C. acnes* RT4 et RT6

	Fractions d'ulvanes		Fractions d'oligo-ulvanes	
	Ulvanes bruts	Ulvanes dialysés	Ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire	Ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide
<b>Suivi de croissance</b>				
<i>S. epidermidis</i> MFP04	=	=	=	=
<i>S. aureus</i> MFP03	=	=	=	=
<b>Biofilm</b>				
<i>S. epidermidis</i> MFP04	=	=	↑* biovolume ↑** épaisseur moyenne	=
<i>S. aureus</i> MFP03	=	=	=	=
<b>Potentiel cytotoxique</b>				
<i>S. epidermidis</i> MFP04	↓ <sup>ns</sup>	=	=	=
<i>S. aureus</i> MFP03	=	=	=	=
<b>Suivi de croissance</b>				
<i>C. acnes</i> RT4	=	=	= (temps de génération) ↓ biomasse finale	=
<i>C. acnes</i> RT6	=	=	=	=
<b>Biofilm</b>				
<i>C. acnes</i> RT4	=	=	=	↓ <sup>ns</sup>
<i>C. acnes</i> RT6	=	=	=	↓ <sup>**</sup>
<b>Potentiel inflammatoire</b>				
<i>C. acnes</i> RT4	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>ns</sup>	↓ <sup>ns</sup>
<i>C. acnes</i> RT6	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>**</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>ns</sup>

↓ : diminution ; = : pas de variation ; ns : non significatif ; \* : significatif en considérant  $p < 0,05$  ; \*\* : significatif en considérant  $p < 0,01$

# **Chapitre 6**

## **Discussion générale**





## Chapitre 6 : Discussion générale

La macroalgue verte *Ulva* sp. est une algue proliférative qui s'échoue sur le littoral breton sous la forme de marées vertes. Sa composition biochimique notamment en polysaccharides pariétaux sulfatés, les ulvanes, font de cette algue une ressource naturelle intéressante à valoriser dans le cadre des enjeux environnementaux, économiques et sociétaux majeurs liés à son échouage. Cette valorisation passe par la mise au point de procédés d'extraction innovants comme l'EAE, de procédés de fractionnement et de purification, et de procédés de dépolymérisation des polysaccharides sulfatés pariétaux. Deux revues récentes font l'hypothèse d'un mimétisme entre les activités biologiques des polysaccharides sulfatés et celles des GAG de la matrice extracellulaire humaine (Kidgell *et al.*, 2019 ; Muhamad *et al.*, 2019). Par ailleurs, des études ont permis de mettre en évidence des bioactivités de polysaccharides sulfatés algaux sur le système cutané avec en particulier la capacité de moduler la synthèse de composants matriciels du derme humain (Senni *et al.*, 1998, 2006 ; Moon *et al.*, 2008 ; Rioux *et al.*, 2013 ; Adrien *et al.*, 2017b ; Park *et al.*, 2019).

La matrice extracellulaire est une structure dynamique où de nombreuses molécules interagissent. Les fibroblastes dermiques humains qui produisent et organisent cette MEC voient leur activité métabolique régulée à leur tour par cette matrice. La composition de cette matrice est ainsi soumise à un équilibre entre une phase dite anabolique (synthèse matricielle) et une phase dite catabolique (dégradation matricielle). L'équilibre entre ces deux phases est indispensable au maintien de l'intégrité du tissu. Néanmoins, lorsque l'homéostasie de la MEC est perturbée, des modifications cutanées naturelles tel que le vieillissement cutané, ou pathologiques comme la fibrose peuvent apparaître.

En complément du maintien de la MEC pour la conservation de l'homéostasie cutanée, le microbiote cutané, découvert plus récemment, est désormais reconnu comme un nouvel acteur également essentiel au maintien de cette homéostasie. Ainsi, lors du développement de métabolites algaux biologiquement actifs sur le système cutané, il convient de s'intéresser à leurs effets sur le microbiote cutané en considérant principalement les espèces dites commensales. À l'heure actuelle, peu d'études ont été réalisées avec cet objectif (Morvan & Vallee, 2018 ; Filaire *et al.*, 2019b ; Freitas *et al.*, 2020).

D'un point de vue fondamental, nous nous sommes intéressés aux activités biologiques potentielles de fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et purifiés) et d'oligo-ulvanes (ulvanes dépolymérisés) issues de l'algue *Ulva* sp.. Tout d'abord, nous nous sommes attachés *via* le procédé classique de macération et innovant de l'EAE à extraire les polysaccharides sulfatés de la paroi cellulaire algale, à les purifier, et à les dépolymériser dans le but d'obtenir des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes de composition biochimique et poids moléculaires différents. Les fractions d'ulvanes font référence aux fractions d'ulvanes polysaccharidiques de haut poids moléculaires (ulvanes bruts et purifiés), et les fractions d'oligo-ulvanes aux fractions d'ulvanes oligosaccharidiques de bas poids moléculaires (ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire et hydrolyse acide).

Dans un premier temps, des effets potentiels sur des activités biologiques notamment dans le cadre de stratégies anti-vieillesse ou de réparation cutanée ont été analysés.

Dans cette optique, l'activité antiradicalaire *via* la méthode du DPPH, l'activité anti-vieillessement *via* l'inhibition de l'élastase et l'activité anti-inflammatoire *via* l'inhibition de la lipoxygénase ont été évaluées. Dans un second temps, les effets potentiels des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur le métabolisme de fibroblastes dermiques humains en culture primaire ont été investigués. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'analyse de l'expression de constituants matriciels intervenant dans la voie anabolique (collagènes de type I et III, et GAG) mais aussi dans la voie catabolique (MMP-1) et sa régulation (TIMP-1).

Enfin, nous avons étudié les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues d'*Ulva* sp. sur le microbiote cutané. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur leurs effets de modulation de la virulence bactérienne de *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes*, trois bactéries sentinelles de ce microbiote.

Par ailleurs, il nous a semblé intéressant d'analyser les effets différentiels d'activités biologiques des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes afin de mettre en évidence une éventuelle relation structure/fonction.

D'un point de vue plus appliqué, l'objectif de ce travail de thèse a consisté à rechercher si les résultats obtenus *in vitro*, sur les constituants de cette algue proliférative *Ulva* sp., pouvaient présenter des perspectives intéressantes en dermo-cosmétique, domaine à haute valeur ajoutée, notamment dans le cadre de stratégies anti-vieillessement ou de réparation cutanée par exemple.

# I. Production de fractions polysaccharidiques et oligosaccharidiques enrichies en ulvanes à activité anti-inflammatoire

## A. Production de fractions polysaccharidiques enrichies en ulvanes : fractions d'ulvanes

---

Dans le chapitre 3, nous avons comparé deux procédés d'extraction : la macération et l'EAE pour l'extraction des ulvanes. Nous avons également procédé à des purifications des fractions brutes (précipitation éthanolique, dialyse, ou saturation au sulfate d'ammonium suivie de précipitation éthanolique et dialyse) afin d'enrichir leur contenu en ulvanes et d'éliminer les composés biochimiques indésirables.

Les ulvanes correspondent à des polysaccharides matriciels sulfatés de la paroi de l'algue *Ulva* sp. (Lahaye & Robic, 2007). La macération est une technique traditionnelle d'extraction des composants hydrosolubles de la paroi algale, qui requiert des conditions de température élevée pour la solubilisation des ulvanes dans l'eau. L'EAE est une technique d'extraction par déstructuration de la paroi algale et de solubilisation des composants.

L'intérêt de l'EAE est donc d'extraire le maximum de composés bioactifs, sans les dénaturer, grâce à des conditions douces de pH et de température (Hardouin *et al.*, 2014a ; Casas & Domínguez González, 2017 ; Peñuela *et al.*, 2018 ; Casas *et al.*, 2019 ; Terme *et al.*, 2020). Cette technique a déjà été appliquée à différents modèles d'algues pour l'extraction de composés bioactifs (Ahn *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2010 ; Wijesinghe *et al.*, 2011 ; Hardouin *et al.*, 2014b, 2016).

### 1. L'extraction des ulvanes

L'objectif principal de l'extraction est de solubiliser le maximum de matière brute algale, en particulier, les ulvanes.

#### a) Composition caractéristique en ulvanes

Les travaux de Lahaye *et al.* (1999) ont montré que différents échantillons issus d'*Ulva* (Ulvales, *Chlorophyta*) présentaient des teneurs en groupements sulfates de 11,3 à 19,8% MS et en sucres totaux de 49,8 à 91,9% MS dont du rhamnose de 27,9 à 58,3%, du glucose de 5,0 à 38,1%, du galactose de 0,9 à 3,1%, du xylose de 5,4 à 28,8%, et de l'acide glucuronique de 11,6 à 30,4%. Plus récemment, Kidgell *et al.* (2019) ont rapporté dans une synthèse bibliographique des teneurs en groupements sulfates allant de 0,4 à 40,0% MS, en sucres de 1,4 à 93,3% MS dont du rhamnose de 5,0 à 92,2%, de l'acide glucuronique de 2,6 à 52,0%, et du xylose de 0,0 à 38,0%. Ces éléments sont les constituants principaux et caractéristiques des ulvanes (Quemener *et al.*, 1997 ; Robic *et al.*, 2009b).

Dans notre étude, toutes les fractions sont donc principalement composées d'ulvanes, caractérisés par la présence de groupements sulfates (25,9 à 49,4% MS), de sucres totaux (21,9 à 37,4% MS) dont du rhamnose (38,8 à 59,4%), de l'acide glucuronique (9,1 à 11,9%), et du xylose (2,2 à 3,6%). Les ulvanes identifiés correspondent par ailleurs probablement majoritairement à des acides ulvanobiuroniques plutôt qu'à des ulvanobioses d'après les plus forts pourcentages d'acide glucuronique que de xylose (Lahaye *et al.*, 1997).

Le galactose est présenté comme un composant des ulvanes sous forme de traces dans les travaux de Lahaye *et al.* (1999), ce qui confirme la faible présence de ce monosaccharide dans les fractions produites (1,1 à 1,6% sucres totaux).

#### b) Rendements de production des ulvanes bruts et purifiés

Lahaye & Robic (2007) ont indiqué que les rendements d'extraction des ulvanes étaient compris entre 8 et 29% du poids sec de l'algue en fonction du protocole d'extraction appliqué et de la matière première utilisée. Plus récemment, Kidgell *et al.* (2019) ont indiqué dans une synthèse bibliographique que les rendements d'extraction des ulvanes étaient compris entre 0,1% pour *U. rotundata* et 90% du poids sec de l'algue pour *U. lactuca*, avec une moyenne pour *Ulva* sp. de 12,2%. Hardouin (2015) a appliqué le procédé de macération sur *Ulva armoricana* aboutissant à un rendement d'ulvanes bruts de 24,5% MS algale. L'EAE a été mise en œuvre une première fois sur *Ulva* sp. en utilisant successivement une cellulase (Celluclast®) puis une protéase (Alcalase®) suivie d'une précipitation éthanolique (Lahaye & Axelos, 1993). Ce protocole a permis l'extraction des ulvanes à hauteur de 12,2% MS algale.

Dans notre étude, les rendements de production des ulvanes bruts par macération et EAE sont respectivement de 37,5% et 42,5% MS algale.

Le rendement quantitatif d'extraction des ulvanes dépend de paramètres employés comme le procédé d'extraction (aqueux simple ou assisté par enzyme) mais aussi des conditions d'extraction utilisées (température et pH) (Yaich *et al.*, 2013, 2014).

D'autres paramètres comme les variations entre les espèces d'ulves (Lahaye *et al.*, 1999), et la saisonnalité (Robic *et al.*, 2009a) influencent la quantité disponible d'ulvanes et donc les rendements, *via* les variations éco-physiologiques dues à la température et la lumière mais aussi au stade de croissance de l'algue. Une étude a montré que la quantité d'ulvanes était dépendante de l'épaisseur de la paroi cellulaire du thalle de l'algue : une augmentation de l'épaisseur étant corrélée à une augmentation de la quantité d'ulvanes potentiellement extractibles (Pankiewicz *et al.*, 2016). Ces différents paramètres expliquent donc les variations de rendements observables comme indiqué par Kidgell *et al.* (2019).

Des techniques de purification des ulvanes ou hydrolysats issus d'*Ulva* sp., autre que la précipitation éthanolique, sont utilisées tels que la dialyse/diafiltration (Lahaye *et al.*, 1998, 1999 ; Hardouin, 2015 ; Thanh *et al.*, 2016 ; Kidgell *et al.*, 2020) ou l'ultrafiltration (Adrien, 2016), la précipitation au sulfate d'ammonium (Adrien, 2016) ou la chromatographie d'échanges d'anions (Ray & Lahaye, 1995 ; Siddhanta *et al.*, 2001 ; Robic *et al.*, 2009d ; Kidgell *et al.*, 2020).

Après précipitation éthanolique, nous avons appliqué soit une étape de dialyse dans le but d'éliminer les sels et molécules de PM < 12 – 14 kDa, soit une nouvelle étape de précipitation éthanolique, soit une étape de saturation au sulfate d'ammonium pour séparer les protéines des polysaccharides suivie d'une précipitation éthanolique et d'une dialyse pour le recouvrement des ulvanes.

Dans l'étude d'Hardouin (2015), les ulvanes bruts, obtenus par macération, ont été purifiés par dialyse aboutissant à un rendement de 18,8% MS algale. D'autres études ont montré un rendement d'extraction d'ulvanes après dialyse compris entre 8 et 15% du poids sec de l'algue (Lahaye *et al.*, 1998, 1999 ; Thanh *et al.*, 2016). Dans notre étude, la dialyse a permis d'obtenir un rendement de 21,2% MS algale. Hardouin (2015) a purifié des ulvanes bruts, obtenus par macération, par précipitation éthanolique conduisant à un rendement de 8,1% MS algale. Au cours de notre étude nous avons obtenu un rendement plus élevé de 23,9% MS algale.

Les travaux d'Adrien (2016) portant sur la purification d'hydrolysats d'*Ulva intestinalis*, obtenus par macération, *via* l'utilisation de la saturation au sulfate d'ammonium, suivie de précipitation éthanolique et dialyse ont abouti à un rendement de 21,9% d'extrait engagé. En appliquant le même procédé de purification aux ulvanes bruts, issus de macération, nous avons obtenu un rendement similaire de 21,2% d'extrait engagé soit 8% MS algale.

Nos résultats sont donc en accord avec les données de littérature reposant sur le fait que les variations de rendements d'extraction des ulvanes dépendent de nombreux paramètres précédemment cités.

## 2. Macération vs EAE : l'EAE un procédé prometteur

### a) Rendements de production : macération vs EAE

Les travaux d'Hardouin *et al.* (2016) ont montré que l'EAE avec l'endo-protéase Protamex® (3 h à 50°C) appliquée à l'algue verte *Ulva armoricana* permet d'obtenir de meilleurs rendements d'extraction d'hydrolysats (88,4% MS algale) que le procédé classique de macération (44,3% MS algale).

Yaich *et al.* (2014) ont obtenu un rendement d'extraction d'ulvanes supérieur par EAE (17,1% MS algale) via l'utilisation successive d'une cellulase (Celluclast®, endo-1,4- $\beta$ -glucanase) et d'une protéase (P-1236 ou Neutrase® 0.8L : endo-protéase neutre) en comparaison à une extraction acide à pH 2 et 80°C (13,1% MS algale).

Dans nos travaux, l'étude de l'impact de l'EAE se fait sur l'extraction des ulvanes et non des hydrolysats. Des augmentations de +5% MS algale pour les ulvanes bruts, +3,6% pour les ulvanes purifiés par dialyse et +8,2% pour les ulvanes purifiés par saturation au sulfate d'ammonium suivie de précipitation éthanolique et dialyse, ont été obtenus en comparaison de la macération. Le remplacement de la macération par l'EAE a permis d'obtenir de meilleurs rendements de production des ulvanes, ce qui est en accord avec les données de la littérature. Par ailleurs, le rendement après purification par précipitation éthanolique est assez similaire par l'application de l'EAE (22,7% MS algale) en comparaison avec la macération (23,8%).

L'EAE apparaît donc comme un procédé intéressant car il permet de meilleurs rendements de production des ulvanes bruts et des ulvanes purifiés avec des conditions plus douces d'extraction qui limitent d'éventuelles modifications chimiques ou thermiques des molécules natives.

### b) Enrichissement en ulvanes et $\beta$ -glucanes par EAE

Hardouin *et al.* (2016) ont montré que le remplacement de l'étape de macération par l'EAE, avec Protamex®, suivie de précipitation éthanolique permet d'enrichir les fractions en rhamnose (+2,1% sucres totaux) et acide uronique (+1% sucres totaux).

Dans notre étude, l'utilisation préliminaire de l'EAE avec Protamex®, en comparaison avec la macération, a permis d'augmenter dans les fractions brutes le contenu en groupements sulfates (+4,0% MS extrait) et sucres totaux (+1,6% MS extrait) dont le rhamnose (+6,0% sucres totaux) et l'acide glucuronique (+1,5% sucres totaux), qui sont les composants spécifiques des ulvanes. De la même façon, les fractions purifiées issues de l'EAE sont plus riches en ulvanes que celles issues de macération. L'emploi de l'EAE en remplacement de la macération permet donc d'enrichir davantage les fractions en ulvanes.

Au cours des travaux de Lahaye & Axelos (1993), l'utilisation successive des enzymes Celluclast® et Alcalase® (endo-protéase alcaline), suivie de précipitation éthanolique, a conduit à la production d'une fraction composée de 41,7% de sucres dont 28,2% de rhamnose, 19,3% d'acide uronique, 5,9% de glucose et 3,2% de xylose. Yaich *et al.* (2014) ont également appliqué successivement Celluclast® et une protéase neutre (P-1236 ou Neutrase® 0.8L) suivie de précipitation éthanolique aboutissant à une fraction composée de 32,2% de sucres dont 52,1% de rhamnose, 37,8% de glucose et 7,3% de xylose.

L'application de l'EAE avec Protamex®, suivie de précipitation éthanolique, dans notre étude a permis la production d'une fraction composée de 23,5% de sucres dont 50,4% de rhamnose, 10,6% d'acide glucuronique, 14,0% de glucose et 3,2% de xylose. L'emploi de Protamex® (complexe d'endo-protéases neutre et alcaline) pourrait donc entraîner un enrichissement plus élevé en rhamnose et glucose de la fraction que l'action successive de cellulase (Celluclast®) et endo-protéase alcaline (Alcalase®), mais pas davantage que l'action successive de Celluclast® et Neutrased® (protéase neutre).

L'emploi de Protamex® dans notre étude conduit également à l'enrichissement en glucose de la fraction brute en comparaison avec la macération. Le complexe enzymatique utilisé conduit donc aussi à la libération de polysaccharides neutres ( $\beta$ -glucanes) sous leur forme native sans dégradation (Hardouin *et al.*, 2016).

Nos travaux confirment donc que l'EAE, avec Protamex®, est un procédé efficace permettant d'améliorer les rendements d'extraction et la composition biochimique des fractions en composants spécifiques de la paroi cellulaire d'*Ulva* sp. : les ulvanes (polysaccharides matriciels) et en polysaccharides neutres ( $\beta$ -glucanes) (Hardouin *et al.*, 2016 ; Casas & Domínguez González, 2017).

### 3. La purification des ulvanes : la dialyse, le procédé le plus efficace

L'objectif de la purification est un taux de recouvrement élevé et une haute pureté des ulvanes. L'efficacité des différents procédés de purification a été mesurée *via* l'étude de la composition biochimique en ulvanes et du taux de recouvrement en polysaccharides.

Dans la littérature, la majorité des étapes de purification se font directement sur les hydrolysats et non sur les ulvanes bruts (Hernández-Garibay *et al.*, 2011 ; Costa *et al.*, 2012 ; Yaich *et al.*, 2014 ; Berri *et al.*, 2017 ; Glasson *et al.*, 2017 ; Wahlström *et al.*, 2020).

Yaich *et al.* (2013) et Costa *et al.* (2012) ont montré que le contenu en matière minérale des ulvanes bruts pouvait être compris entre 33,4 et 44,1% MS. Le contenu en matière minérale dans notre étude (35,2 à 38,0% MS) est en accord ces données de littérature.

L'application de la dialyse a pour objectif principal la réduction de la composition en sels et donc en matière minérale. Les seuils de coupure utilisés dans les procédés de dialyse sont compris entre 3,6 et 12 kDa (Siddhanta *et al.*, 2001 ; Qi *et al.*, 2005b) avec un équilibre entre la rétention d'ulvanes et le rendement « temporel » optimisé à 10 kDa (Robic *et al.*, 2008 ; Yaich *et al.*, 2014 ; Glasson *et al.*, 2017). Dans notre étude, l'utilisation de la dialyse avec un seuil de coupure de 12 – 14 kDa a effectivement permis de réduire significativement la teneur en matière minérale jusque 13,2 à 13,4% MS et donc d'éliminer efficacement les sels (-25%). De plus, la comparaison des trois procédés de purification appliqués aux ulvanes bruts a permis de conclure que la dialyse aboutit au recouvrement le plus élevé en polysaccharides (84,7 à 88,6% MS) et à une composition en ulvanes plus élevée *via* les pourcentages élevés en groupements sulfates (49,1% MS), en sucres (37,4% MS) et en acides uroniques (37,0% MS).

Les protéines ont déjà été décrites comme des contaminants potentiels de l'extraction des polysaccharides pariétaux, du fait de leur rôle dans la structure des paroi et leur étroite association aux polysaccharides (Robic *et al.*, 2008, 2009c). Dans une synthèse bibliographique, Kidgell *et al.* (2019) ont présenté des teneurs en protéines au sein de fractions d'ulvanes issues d'*Ulva sp.* comprises entre 4% et 11,6% (w/w). Un « ulvane de référence » issu d'*Ulva armoricana*, commercialisé par CarboSynth, a une teneur en protéine de 7,4% (Wahlström *et al.*, 2020).

Dans notre étude, la teneur en protéines des ulvanes bruts représente jusque 10,5% (w/w). Ce résultat est donc en accord avec les données de littérature. L'élimination totale des protéines sans affecter la structure des ulvanes reste donc un challenge à relever.

La saturation au sulfate d'ammonium est un procédé classiquement utilisé après extraction aqueuse pour l'extraction de protéines algales (Suresh Kumar *et al.*, 2014 ; Harrysson *et al.*, 2018 ; Kazir *et al.*, 2019). Harrysson *et al.* (2018) ont montré que le procédé de saturation au sulfate d'ammonium n'entraîne pas que l'extraction des protéines algales mais aboutit davantage à une co-précipitation des protéines et des sucres, supposant une liaison forte entre sucres et protéines.

Dans notre étude, l'utilisation de la saturation au sulfate d'ammonium a pour but d'éliminer les protéines des fractions d'ulvanes bruts. Néanmoins, cela aboutit comme dans les travaux d'Harrysson *et al.* (2018) à la co-précipitation des sucres et protéines. Ceci expliquerait le faible rendement de production de cette fraction (8,0 à 16,2% MS algale) et l'échec de l'appauvrissement de la fraction en protéines.

D'autres travaux montrent que l'utilisation de techniques enzymatiques reposant sur l'utilisation de protéinases permettent de réduire efficacement la teneur en protéines des fractions (Costa *et al.*, 2012 ; Wahlström *et al.*, 2020). Toutefois, l'application de la protéinase se fait sur l'hydrolysate et non sur l'ulvane brut obtenu. L'utilisation par Costa *et al.* (2012) et Wahlström *et al.* (2020) de la protéinase K a permis d'obtenir un contenu final en protéines de 3,3% et 6,5% pour les ulvanes issus d'*U. lactuca* et *U. compressa* respectivement (après précipitation éthanolique), et 1,1% pour l'hydrolysate issu d'*U. lactuca*. D'autres travaux proposent que l'extraction acide suffit à réduire les teneurs en protéines extraites sans purification ultérieure. Hernández-Garibay *et al.* (2011) et Glasson *et al.* (2017) ont réduit drastiquement la teneur en protéines de fractions d'*Ulva clathrata* et *U. ohnoi* par extraction acide (0,2 N HCl et 0,05 M HCl respectivement) jusque 0,4% (w/w). En effet, l'extraction des ulvanes à pH acide, notamment à  $\text{pH} < \text{pKa}$  des acides uroniques ( $\text{pKa}$  de 3,28) et groupements sulfates ( $\text{pKa}$  de 2,0), réduirait la charge totale des ulvanes limitant leurs interactions électrostatiques avec les acides aminés des protéines chargés positivement de la paroi cellulaire (Robic *et al.*, 2009c ; Glasson *et al.*, 2017). Cependant, l'extraction acide des ulvanes présente l'inconvénient d'entraîner la perte des groupements sulfates à l'origine éventuelle d'une perte de leurs propriétés biologiques (Kidgell *et al.*, 2019).

Finalement, quel que soit le procédé de purification employé dans notre étude, la teneur en protéines reste inchangée. Ces résultats confirment que les polysaccharides sulfatés sont étroitement associés aux protéines au niveau de la paroi cellulaire d'*Ulva sp.* et sont donc systématiquement co-extraits avec les ulvanes à pH neutre (Robic *et al.*, 2008, 2009c).



Il apparaît donc difficile d'éliminer efficacement les protéines pouvant être co-extraites en conservant le degré de sulfatation des ulvanes par l'emploi de techniques non enzymatiques.

Le glucose est présenté comme un contaminant des ulvanes probablement dû à de l'amidon ou de la cellulose ( $\beta$ -glucanes) co-extrait avec les ulvanes (Kidgell *et al.*, 2019 ; Wahlström *et al.*, 2020). L'emploi des trois procédés de purification dans notre étude a permis de réduire la teneur en glucose d'un facteur 1,3 à 4,2 et d'augmenter parallèlement la teneur en ulvanes. La dialyse, après EAE et précipitation éthanolique, présente la meilleure capacité d'élimination du glucose et d'enrichissement en ulvanes.

Finalement, notre étude met en évidence qu'après extraction par EAE avec Protamex®, le meilleur procédé de purification des ulvanes correspond à la dialyse.

## **B. Dépolymérisation des ulvanes pour la production de fractions oligosaccharidiques : fractions d'oligo-ulvanes**

---

### **1. Fractions d'ulvanes de hauts poids moléculaires**

L'analyse préliminaire des fractions d'ulvanes purifiés par précipitation éthanolique (PP-UM et PP-UE) a mis en évidence que celles-ci étaient composées d'ulvanes de hauts poids moléculaires moyen avec  $M_w = 3171$  kDa pour PP-UM et  $M_w = 2290$  kDa pour PP-UE. Par ailleurs, les indices de polydispersité des fractions sont relativement faibles (1,9 et 1,4 pour PP-UM et PP-UE respectivement) indiquant que ces fractions sont réellement constituées de hauts poids moléculaires. La différence de poids moléculaire entre la fraction obtenue par macération et celle par EAE serait liée à la température d'extraction initiale des ulvanes bruts (90°C pour la macération contre 50°C pour l'EAE). En effet, une température élevée d'extraction serait adéquate à l'extraction d'ulvanes de hauts poids moléculaires comme le suggère Yamamoto (1980). Nos résultats de poids moléculaires moyen de fractions d'ulvanes et d'homogénéité de la distribution de poids moléculaires sont en accord avec ceux de la littérature, avec par exemple des ulvanes de 1068,2 kDa et d'indice de polydispersité de 1,14 dans les travaux de Chi *et al.* (2020) et de 2790 kDa dans ceux de Yaich *et al.* (2017).

### **2. Deux procédés de dépolymérisation efficaces**

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la dépolymérisation de ces fractions polysaccharidiques de hauts poids moléculaires issues de la macroalgue *Ulva* sp. (ulvanes purifiés par précipitation éthanolique).

L'objectif principal de la dépolymérisation est la production de fractions de bas poids moléculaires potentiellement bioactives. Ceci permet d'évaluer une potentielle relation structure/fonction entre le poids moléculaire des ulvanes et des activités biologiques cibles. De plus, les activités de ces fractions de bas poids moléculaires pourraient être accrues *in vivo* grâce à un passage transcutané facilité et donc une grande biodisponibilité.

Dans la littérature, différents procédés de dépolymérisation ont été appliqués aux ulvanes comme :

- La dépolymérisation chimique par hydrolyse acide ou alcaline (Adrien *et al.*, 2017b ; Llano Astuy *et al.*, 2020), ou par hydrolyse radicalaire/induite par le peroxyde d'hydrogène (Pengzhan *et al.*, 2004).
- La dépolymérisation enzymatique utilisant principalement l'ulvane lyase (Lahaye *et al.*, 1997 ; Collén *et al.*, 2011 ; Coste *et al.*, 2015 ; Chi *et al.*, 2020 ; Mondal & Ohnishi, 2020).
- La dépolymérisation physique par procédé thermique (Pengzhan *et al.*, 2003), microondes, irradiations- $\gamma$  et ultrasons (Jaulneau *et al.*, 2010).

Dans nos travaux, nous avons uniquement sélectionné deux procédés de dépolymérisation chimique : l'hydrolyse acide par utilisation d'une résine échangeuse d'ions et l'hydrolyse radicalaire induite par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). La sélection de ces deux procédés chimiques de dépolymérisation repose sur le coût réduit de mise en œuvre dans une optique de valorisation de la biomasse algale.

Tout d'abord, en termes de rendements, la dépolymérisation des ulvanes par hydrolyse acide utilisant la résine échangeuse d'ions Amberlite FPC23 H a abouti à un rendement de 30,1 à 34,3% d'extrait engagé, ce qui est plus faible que le rendement de 73,2% obtenu par Lahaye *et al.* (1998) utilisant la résine acide IR120. Dans notre étude, la dépolymérisation par hydrolyse radicalaire utilisant  $H_2O_2$  a mené à un rendement de 56,4 à 55,7% d'extrait engagé, ce qui est en accord avec les travaux de Pengzhan *et al.* (2004). En effet, dans leur étude, la préparation d'ulvanes de différents poids moléculaires *via* l'utilisation de la dépolymérisation par  $H_2O_2$  a permis l'obtention de rendements de 58,4 à 67,7% selon leurs conditions de dépolymérisation (Pengzhan *et al.*, 2004). Nos données de rendements de dépolymérisation par hydrolyse radicalaire sont donc en accord avec la littérature.

Par ailleurs, les deux procédés de dépolymérisation mis en œuvre ont été efficaces puisque ceux-ci ont permis l'obtention de fractions oligosaccharidiques d'ulvanes de bas poids moléculaires aussi nommées oligo-ulvanes dans d'autres travaux (Robic *et al.*, 2009a ; Collén *et al.*, 2011 ; Mondal & Ohnishi, 2020).

En effet, le procédé de dépolymérisation par hydrolyse acide utilisant une résine échangeuse d'ions a permis la production de fractions de bas poids moléculaires (1,5 kDa). Des études antérieures ont déjà rapporté la dépolymérisation des ulvanes par hydrolyse acide sur résine pendant 24 h à 80°C comme étant un procédé efficace par combinaison de température élevée, de pH faible et de durée longue d'extraction (Lahaye *et al.*, 1998 ; Adrien *et al.*, 2017b). Nos travaux sont en accord avec ceux d'Adrien *et al.* (2017b) dans lequel le même procédé de dépolymérisation a permis la production d'oligo-ulvanes de 4 kDa. Le poids moléculaire plus faible des oligo-ulvanes de notre étude pourrait être lié au contact constant entre la solution de polysaccharides et la résine, *a contrario* de leur étude, où la solution de polysaccharides circule dans une colonne. De plus, ce procédé de dépolymérisation sur résine présente l'avantage de produire des fractions homogènes (indice de polydispersité de 1,1) comme dans les travaux d'Adrien *et al.* (2017b). Il a également l'avantage d'être répétable, en comparaison des procédés d'hydrolyse acide utilisant l'acide chlorhydrique, sulfurique, trifluoroacétique, formique, ou nitrique qui sont difficiles à contrôler, et qui génèrent des monosaccharides mais aussi des produits indésirables comme des sels (Delattre *et al.*, 2005).

Les travaux de Pengzhan *et al.* (2004) et Qi *et al.* (2005a) ont porté sur la dépolymérisation d'ulvanes par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cependant les paramètres maximum employés étaient une durée de 7 h et une température de 50°C aboutissant au minimum à des ulvanes de 28,2 kDa et d'indice de polydispersité 1,9.

Nous nous sommes attachés à l'optimisation du procédé de dépolymérisation des ulvanes par hydrolyse radicalaire induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour l'obtention d'ulvanes de plus bas poids moléculaires et avec une distribution plus homogène du profil de tailles.

Nous avons pu mettre en évidence que la plus longue durée d'extraction (24 h) à 50°C aboutissait à la dépolymérisation la plus efficace des ulvanes pour l'obtention d'oligo-ulvanes de bas poids moléculaires (4 – 7 kDa) avec une distribution homogène du profil de tailles (indice de polydispersité de 1,2 à 1,3).

Nos travaux confirment les données de littérature indiquant que le niveau de dépolymérisation (poids moléculaire et dispersité) dépend du temps de réaction et de la température, et plus spécifiquement que le poids moléculaire et la dispersité des fractions diminuent avec l'augmentation du temps et de la température d'hydrolyse (Pengzhan *et al.*, 2004 ; Qi *et al.*, 2005a ; Zhang *et al.*, 2008 ; Kidgell *et al.*, 2020).

Néanmoins, nos résultats sur la fraction issue de macération mettent en avant que ce procédé ne semble pas aussi répétable que celui de dépolymérisation sur résine. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la dépolymérisation radicalaire est un procédé suggéré comme aléatoire mais sélectif (Delattre *et al.*, 2005). En effet, Kidgell *et al.* (2020) ont montré que la dépolymérisation des ulvanes d'*Ulva ohnoi* par hydrolyse radicalaire utilisant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, était sélective au niveau du carbone anomérique. Ainsi, la dépolymérisation radicalaire des ulvanes correspond à la rupture entre deux sucres au niveau du carbone anomérique mais celle-ci peut avoir lieu aléatoirement entre les différents monosaccharides de l'ulvane.

### 3. Des fractions d'oligo-ulvanes appauvries en sulfates

D'autre part, nous avons montré que les fractions oligosaccharidiques de bas poids moléculaires étaient également riches en acides uroniques dont l'acide glucuronique et en sucres dont le rhamnose, le glucose et le xylose, autrement dit riches en oligo-ulvanes (Lahaye *et al.*, 1998).

L'un des résultats marquants de la dépolymérisation est la perte de groupements sulfates (quantifiée par la méthode de l'Azure A) quelque ce soit le procédé employé. En effet, les sulfates, détectés par la méthode de l'Azure A, ne représentent plus que 5,0 à 6,6% MS au niveau des oligo-ulvanes issus de l'hydrolyse radicalaire, et 0% pour oligo-ulvanes issus de l'hydrolyse acide sur résine. Néanmoins, les ions pseudo-moléculaires identifiés par MALDI-TOF sur les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide suggèrent tout de même la présence de groupements sulfates liés à la chaîne glucidique. En effet, la méthode de dosage des groupements sulfates utilisée reposant sur l'Azure A est un dosage semi-quantitatif qui donne un ordre de grandeur (~ mg) de la concentration en sulfates de l'échantillon (Pierre, 2010). La quantité de sulfates ainsi présente sur la chaîne glucidique au sein des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide serait donc en dessous de la limite de détection de la méthode de l'Azure A.

Aussi, la dépolymérisation sur résine échangeuse d'ions sur colonne des travaux d'Adrien *et al.* (2017b) a permis de retenir 70% des sulfates par rapport à la fraction de départ (soit 8% MS) ce qui diffère de notre étude où la résine est directement dans le milieu.

Par ailleurs, dans notre étude, la dépolymérisation radicalaire permet de garder davantage de groupements sulfates au niveau de ces oligo-ulvanes. Les résultats de Kidgell *et al.* (2020) confirment notre hypothèse que l'hydrolyse radicalaire permet de conserver les groupements sulfates bien qu'une baisse de leur teneur soit effectivement induite par le procédé.

Ainsi, la dépolymérisation chimique entraîne une désulfatation substantielle des ulvanes. Ce résultat est en accord avec des travaux précédents où la désulfatation est présentée comme une réaction secondaire de la méthode de dépolymérisation (Percival & McDowell, 1968 ; Ray & Lahaye, 1995).

De ce fait, les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes présentent des différences d'abondance en ulvanes, de degré de sulfatation et de distribution de poids moléculaires, intéressantes dans le cadre d'évaluation d'activités biologiques et de mise en évidence d'une relation structure/fonction.

### C. Recherche d'activités biologiques des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à des fins d'applications cosmétiques

---

Dans le cadre du développement d'un ingrédient actif pour le domaine dermo-cosmétique, différentes activités biologiques peuvent être évaluées selon l'objectivation désirée. Parmi les différents modèles d'évaluation, le modèle *in vitro* est largement utilisé. Parmi ce modèle, les méthodes chimiques et enzymatiques sont ainsi particulièrement intéressantes dans l'apport de réponses biologiques préliminaires.

Dans notre étude, à la suite de la production de fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de leurs effets potentiels sur des activités biologiques notamment dans le cadre de stratégies anti-vieillessement ou de réparation cutanée pour des applications cosmétiques. À cette fin, l'activité antiradicalaire *via* le test DPPH, l'activité anti-inflammatoire *via* l'inhibition de la lipoxygénase et l'activité anti-vieillessement *via* l'inhibition de l'élastase ont été étudiées *in vitro* par utilisation de méthodes chimiques et enzymatiques classiques.

#### 1. Recherche d'activité antiradicalaire par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes

Le stress oxydatif est un des mécanismes majeurs impliqué dans le vieillissement cutané. Une exposition à des facteurs environnementaux tels que les rayons UV aboutit à l'altération des tissus conjonctifs et entraîne une rupture de l'équilibre antioxydant/pro-oxydant cellulaire. Le stress oxydatif induit se traduit donc par une production excessive de ROS (espèces réactives de l'oxygène) que la cellule n'est pas capable de réguler *via* ses systèmes antioxydants (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase). Les ROS regroupent des espèces oxygénées comme les radicaux libres (atome ou molécule contenant un électron non apparié) et les peroxydes.

Les acides aminés, les protéines et les AGPI présents au niveau cellulaire sont des cibles majeures des attaques effectuées par ces ROS. Une fois modifiées, ces molécules perdent leur activité et la physiologie cellulaire s'en voit modifiée (Migdal & Serres, 2011). Ainsi, un actif présentant un pouvoir antioxydant ou antiradicalaire permet de lutter contre ces ROS soit en les neutralisant soit en favorisant leur décomposition. De nombreux test *in vitro* permettent d'évaluer le pouvoir antioxydant ou antiradicalaire d'un actif : test au DPPH, test ORAC : « Oxygen Radical Absorbance Capacity », FRAP : « Ferric Reducing-Antioxidant Power », décoloration de l'ABTS : acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), etc. (Antolovich *et al.*, 2002).

Dans notre étude, l'activité antiradicalaire de nos fractions a été évaluée par le test DPPH. Le test permet de déterminer la capacité de la fraction à réduire ce radical libre (DPPH<sup>\*</sup>) par transfert d'hydrogène sur ce dernier et à former la molécule stable de DPPH-H. Ce test DPPH est couramment utilisé pour la mise en évidence d'activité antioxydante/antiradicalaire de polysaccharides algaux comme le montre les nombreuses données de littérature disponibles (Xu *et al.*, 2015 ; Peasura *et al.*, 2015, 2016 ; Rahimi *et al.*, 2016 ; Rostami *et al.*, 2017 ; Yaich *et al.*, 2017 ; Zhao *et al.*, 2018 ; Maneesh & Chakraborty, 2018 ; Sellimi *et al.*, 2018 ; Fernando *et al.*, 2018b ; Le *et al.*, 2019 ; Jesumani *et al.*, 2019b ; Freitas *et al.*, 2020).

Dans notre étude, les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes n'ont pas démontré d'activité antiradicalaire aux concentrations testées de 50, 100, 250, 500 et 1000 µg/ml. Cependant, d'autres études portant sur les ulvanes ont démontré une activité radicalaire de ces polysaccharides *via* le test DPPH (Peasura *et al.*, 2016 ; Rahimi *et al.*, 2016 ; Yaich *et al.*, 2017 ; Le *et al.*, 2019). Nos résultats ne sont donc pas en accord avec les données de littérature. En effet, Le *et al.* (2019) ont montré que les ulvanes d'*Ulva pertusa* obtenus par extraction assistée par micro-ondes présentent un effet de piégeage du DPPH dose-dépendant de 5,6% à 46,5% pour des concentrations croissantes de 25 à 800 µg/ml. Des ulvanes extraits de l'algue *Ulva intestinalis* par extraction assistée par ultrasons présentent également une activité de piégeage du DPPH dose-dépendante pour des concentrations plus élevées de 500 à 5000 µg/ml (74% d'inhibition au maximum) (Rahimi *et al.*, 2016). Dans l'étude de Yaich *et al.* (2017), les ulvanes extraits par hydrolyse acide et EAE (cellulase suivie de protéase) d'*Ulva lactuca* présentent des CI<sub>50</sub> d'inhibition radicalaire de 13,6 à 38,2 µg/ml selon les conditions d'hydrolyse et de 67,38 µg/ml pour l'EAE. Les auteurs suggèrent que la fraction d'ulvanes de plus haut poids moléculaire (2790 kDa) qui est aussi la plus pauvre en rhamnose (12,73%) et acides uroniques (22,37%) présente la meilleure activité antiradicalaire. Peasura *et al.* (2016) ont également démontré l'efficacité des ulvanes d'*Ulva intestinalis* sur la capacité de piégeage du DPPH (50% à 80% selon le poids moléculaire).

Néanmoins, Peasura *et al.* (2016) suggèrent que les polysaccharides sulfatés de hauts poids moléculaires (> 330 kDa) pourraient ne pas exposer beaucoup de fragments actifs, tandis que les polysaccharides sulfatés de bas poids moléculaires (< 80 kDa) ne sont probablement pas capables de former une configuration appropriée pour présenter une activité antioxydante. Un poids moléculaire adapté semble essentiel à l'activité antiradicalaire des ulvanes (Peasura *et al.*, 2016).

Ainsi, les poids moléculaires des fractions d'oligo-ulvanes (< 10 kDa) et d'ulvanes (> 670 kDa) de notre étude pourraient expliquer l'absence d'activité antiradicalaire.

Par ailleurs, le potentiel antioxydant exercé par les polysaccharides et les mécanismes sous-jacents mis en œuvre ne sont pas systématiquement élucidés. En effet, l'activité antioxydante des ulvanes semble également dépendre de nombreux facteurs comme la teneur en groupements sulfates (Qi *et al.*, 2005b ; Zhang *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2017), le poids moléculaire (Qi *et al.*, 2005a ; Zhang *et al.*, 2011 ; Peasura *et al.*, 2015 ; Yaich *et al.*, 2017), la composition en monosaccharides (Yaich *et al.*, 2017), la composition en groupes hydroxyle et carboxyle, la composition en liaisons glycosidiques (Lo *et al.*, 2011), ainsi que la capacité de don d'atome d'hydrogène (Wang *et al.*, 2016b).

L'activité antiradicalaire présentée dans ces études pourraient aussi être liée à la présence d'autres composés comme des pigments, des flavonoïdes, des peptides/protéines, ou des polyphénols (Hardouin *et al.*, 2016) qui contribueraient à l'activité antiradicalaire (Wang *et al.*, 2016b). Toutefois, étant donné l'absence d'activité de piégeage du DPPH dans notre étude, il semble difficile de privilégier l'une de ces hypothèses.

## 2. Activité anti-inflammatoire par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes

Au niveau cutané, il est largement connu que le stress oxydatif, en plus de la sécrétion de ROS et de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ ), entraîne l'activation d'enzymes pro-inflammatoires dont les cyclooxygénase, lipoxygénase et phospholipase A2 (Pillai *et al.*, 2005).

Les lipoxygénases (LOX), capables de catalyser la dioxygénation des AGPI, constituants principaux des lipides membranaires, sont très impliquées dans la phase inflammatoire suite à une altération du système cutané. La lipoxygénase catalyse l'incorporation régio- et stéréo-spécifique de dioxygène sur le système (1Z,4Z)-pentadiène d'un AGPI comme l'acide arachidonique pour générer un hydroperoxyde d'acide gras (Feussner & Wasternack, 2002 ; Sanda Chedea & Jisaka, 2011 ; Mashima & Okuyama, 2015). Les hydroperoxydes ainsi formés et les LOX (5- et 15-) participent à la biosynthèse de médiateurs inflammatoires : les leucotriènes (famille des eicosanoïdes) et à l'expression de facteurs de croissance comme le TNF- $\alpha$ , et ont donc un rôle majeur dans l'inflammation (Wen *et al.*, 2007 ; Haeggström & Funk, 2011 ; Lin *et al.*, 2014).

Dans la littérature, des études ont permis de démontrer que les polysaccharides algaux présentent une activité anti-inflammatoire sur des macrophages murins RAW 264.7 (Rostami *et al.*, 2017 ; Fernando *et al.*, 2018b, c ; Le *et al.*, 2019 ; Kidgell *et al.*, 2020), sur un modèle animal comme le rat (Mohsin & Muraleedhara Kurup, 2011 ; Sarithakumari & Kurup, 2013) ou sur des cellules de peaux humaines/épidermes reconstruits humains (Fitton *et al.*, 2015 ; Ozanne *et al.*, 2020). Par ailleurs, plusieurs travaux ont également été réalisés en s'intéressant spécifiquement à l'inhibition de la lipoxygénase par des actifs algaux pour une activité dite anti-inflammatoire (Matsukawa *et al.*, 1997 ; Al-Amoudi *et al.*, 2009 ; Mohsin & Muraleedhara Kurup, 2011 ; Vera *et al.*, 2011 ; Sarithakumari & Kurup, 2013 ; Kurihara *et al.*, 2014 ; Sujina *et al.*, 2016 ; Chakraborty & Antony, 2019).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'inhibition de la lipoxygénase, issue du soja, *via* un test chimio-enzymatique.

Il a été mis en évidence en 1996, que la lipoxygénase issue du soja et la 15-lipoxygénase humaine présentaient des similitudes structurelles avec l'importance d'un résidu d'acide aminé chargé positivement et d'un résidu d'acide aminé aromatique pour la liaison de l'acide arachidonique (Gan *et al.*, 1996).

Nos résultats ont montré que les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à la concentration de 500 µg/ml présentaient une activité anti-inflammatoire *via* le test d'inhibition de la LOX. Les fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et purifiés), et les oligo-ulvanes obtenus par hydrolyse radicalaire inhibent la LOX de 38 à 55%.

En revanche, les oligo-ulvanes obtenus par hydrolyse acide inhibent plus faiblement la LOX (8,0 à 15,6%). Nos travaux, sont les premiers à l'heure actuelle, à avoir mis en évidence une capacité inhibitrice des ulvanes sur la LOX (Fournière *et al.*, 2019).

Néanmoins, deux récentes études ont montré que d'autres polysaccharides sulfatés, plus précisément des polygalactofucanes sulfatés issus de l'algue brune *Sargassum wightii* et des polygalactanes sulfatés issus de deux algues rouges *Kappaphycus alvarezii* et *Gracilaria opuntia*, présentaient également une activité anti-inflammatoire. Cette activité a été démontrée *via* le potentiel inhibiteur de la 5-lipoxygénase avec une  $CI_{90}$  de 1,02 mg/ml pour les polygalactofucanes sulfatés de *S. wightii* et des  $CI_{50}$  de 0,34 mg/ml et 0,24 mg/ml pour les polygalactanes sulfatés de *K. alvarezii* et *G. opuntia* respectivement (Makkar & Chakraborty, 2017 ; Maneesh & Chakraborty, 2018). Au niveau d'algues vertes, les précédentes études n'ont porté que sur l'évaluation du potentiel d'extraits aqueux sur l'inhibition de la LOX (Matsukawa *et al.*, 1997 ; Al-Amoudi *et al.*, 2009). En effet, Matsukawa *et al.* (1997) ont montré une activité inhibitrice de la LOX d'environ 9% en présence d'un extrait aqueux issu de l'algue verte *Enteromorpha linza*. Al-Amoudi *et al.* (2009) ont démontré une activité inhibitrice de la LOX de 24% en présence d'un extrait aqueux issu de l'algue verte *Ulva lactuca*. Nos résultats et les données de littérature vont donc dans le sens d'une activité inhibitrice de la lipoxygénase par des polysaccharides sulfatés algaux et *a minima* d'extraits algaux issus de la famille des *Ulvaceae*. Matsukawa *et al.* (1997) proposent que le mécanisme d'inhibition de la LOX reposerait sur le blocage de l'addition enzymatique d'oxygène sur le substrat d'acide gras.

### **3. Recherche d'activité anti-vieillessement *via* l'inhibition de l'élastase par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes**

L'élastase est une protéase qui dégrade spécifiquement l'élastine, protéine structurelle et fonctionnelle importante au niveau de la peau. Dans les conditions cutanées normales, l'élastase est essentielle dans le processus de réparation cutanée (Wilgus *et al.*, 2013). Néanmoins, une surexpression de l'activité élastase induite avec l'âge ou suite à une surexposition aux UV ou aux dommages oxydatifs, entraîne la dégradation de l'élastine et aboutit à la perte de fermeté et d'élasticité de la peau, avec notamment l'apparition de rides (Kristensen *et al.*, 2019).



Dans notre étude, l'évaluation de l'activité anti-vieillesse testée en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à la concentration de 500 µg/ml n'a pas démontré d'activité inhibitrice de l'élastase. Aucune étude sur les ulvanes n'a été publiée dans le cadre de l'évaluation d'activité anti-élastase.

Une étude récente a montré que les polysaccharides sulfatés de la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* du phylum *Chlorophyta* ont une activité inhibitrice de l'élastase de 71 et 90% aux concentrations de 1 et 2 mg/ml respectivement (Falcao *et al.*, 2020).

Une étude portant sur un extrait obtenu par traitement hydrothermal à 160°C issu de l'algue brune *Himanthalia elongata* a montré que pour la gamme de concentrations testées (0,001 à 2000 µg/ml), celui-ci ne présentait pas d'effet inhibiteur de l'activité élastase de neutrophile humain (Cernadas *et al.*, 2019).

La majorité des données de littérature concernant l'inhibition de l'activité élastase s'intéressent aux polysaccharides sulfatés riches en fucose des algues brunes (Senni *et al.*, 1998 ; Fitton *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2018, 2020 ; Fernando *et al.*, 2018b).

Une étude a démontré l'activité anti-élastase de polysaccharides sulfatés riches en fucose issus d'*Ascophyllum nodosum* sur l'élastase de neutrophile humain (51,8 et 54,5% aux concentrations de 1 et 10 µg/ml respectivement) (Senni *et al.*, 1998). Les auteurs suggèrent que cet effet d'inhibition serait dû à la densité de charge anionique des polysaccharides sulfatés riches en fucose. En effet, l'élastase étant une protéine contenant des groupes de 18 résidus d'arginine cationiques, des interactions électrostatiques peuvent exister entre cette protéine et les polysaccharides sulfatés riches en fucose (Senni *et al.*, 2006).

Une autre étude a montré que les extraits de *Fucus vesiculosus* et *Undaria pinnatifida* enrichis en polysaccharides sulfatés riches en fucose (58,6 et 89,6% respectivement) ont des activités anti-élastases de neutrophiles humains avec des  $CI_{50}$  de 60 et 55 µg/ml respectivement (Fitton *et al.*, 2015). Fernando *et al.* (2018b) ont également démontré que les polysaccharides sulfatés riches en fucose issus des algues brunes *Chnoospora minima* et *Sargassum polycystum* présentent bien une activité d'inhibition d'élastase aux concentrations de 100, 200 et 400 µg/ml de 20 à 40% pour *Chnoospora minima*, et de 60 à 80% pour *Sargassum polycystum*. Jesumani *et al.* (2019b) ont montré que les polysaccharides sulfatés de plusieurs espèces de sargasses (*S. vachellianum*, *S. horneri* et *S. hemiphyllum*) présentent une activité dose-dépendante d'inhibition de l'élastase avec une activité maximale testée de 30% à la concentration de 1000 µg/ml. Les polysaccharides bruts des algues brunes *Ecklonia maxima* et *Sargassum fusiforme* inhibent de manière dose-dépendante l'élastase issue du pancréas de porc (11,4 à 25,5% pour *E. maxima* aux concentrations de 25, 50 et 100 µg/ml, et de 18,8 à 56,5% pour *S. fusiforme* aux concentrations de 50, 100 et 200 µg/ml) (Wang *et al.*, 2018, 2020). La majorité de ces études présentent une corrélation entre la teneur en sulfate et l'activité d'inhibition de l'élastase (Senni *et al.*, 2006 ; Jesumani *et al.*, 2019b ; Freitas *et al.*, 2020). Toutefois, les résultats de notre étude ne vont pas dans ce sens.

Étant donné la proportion d'études portant sur les algues brunes, ceci pourrait être également lié à leur composition monosaccharidique riche en L-fucose.



En effet, Andrès *et al.* (2006) ont montré que des poly- et oligosaccharides riches en rhamnose (50%), acide glucuronique et galactose ne présentent aucune activité d'inhibition de l'élastase de fibroblastes dermiques humains. Nos travaux portant sur des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes exhibant une composition monosaccharidique similaire sont donc en accord avec les travaux de cette étude d'Andrès *et al.* (2006).

Par ailleurs, la nature de l'élastase (pancréas de porc, neutrophile humain, etc.) et du substrat utilisés (élastine ou Suc-Ala-Ala-Ala-NH-Np) est un paramètre important dans la mesure de l'activité. En effet, l'étude de Redini *et al.* (1988) montre que l'héparine, polysaccharide sulfaté de *N*-acétylglucosamine et acide iduronique, extrait de muqueuses de mammifères (intestins de porc ou poumon de bœuf par exemple), n'inhibe pas l'élastase issue du pancréas de porc alors qu'elle inhibe bien l'élastase de neutrophile humain en présence du substrat Suc-Ala-Ala-Ala-NH-Np. Toutefois, les auteurs montrent également que l'héparine inhibe l'activité de l'élastase de pancréas de porc pour des concentrations supérieures à 1 mg/ml lorsque de l'élastine est utilisée comme substrat et qu'aucune inhibition n'est faite aux concentrations de 0,1 à 5 mg/ml sur le substrat Suc-Ala-Ala-Ala-NH-Np (Redini *et al.*, 1988). Ainsi, nos travaux vont dans ce sens puisque nous avons montré l'inactivité de nos fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'élastase de pancréas de porc en utilisant le substrat *N*-methoxysuccinyl-(ala)<sub>2</sub>-pro-val-*p*-nitroanilide. Il pourrait être intéressant, afin de compléter notre étude, d'évaluer l'activité des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'élastase de fibroblastes dermiques humains en utilisant un substrat d'élastine.

Notre étude a permis de mettre en évidence que l'EAE appliquée à l'algue verte *Ulva* sp., en plus d'être un procédé à la fois innovant et durable, augmente les rendements de production et enrichit les fractions en ulvanes en comparaison avec la macération. Nous avons également montré que les procédés de purification employés aboutissaient à un enrichissement en ulvanes mais ne permettaient pas de s'affranchir des protéines fortement liées à ces ulvanes. Les procédés de dépolymérisation employés ont permis dans nos travaux d'obtenir des fractions d'oligo-ulvanes de bas poids moléculaires mais appauvries en sulfates. Les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes produites présentent donc un fort intérêt pour l'investigation d'une relation structure/fonction, notamment du fait des différences d'abondance en ulvanes, du degré de sulfatation et du poids moléculaire des ulvanes.

Aussi, l'ensemble des résultats d'activités biologiques nous ont permis de mettre en évidence un potentiel des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes dans le cadre d'une stratégie de réparation cutanée pour des applications en cosmétique notamment *via* l'activité anti-inflammatoire.

Afin d'approfondir l'évaluation des activités biologiques exercées par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, il apparaît indispensable de s'intéresser aux cellules du système cutané régissant les fonctions de ce système. Les fibroblastes dermiques humains sont en effet les acteurs du maintien ou de la modification de la MEC. L'étude *in vitro* sur les fibroblastes permet également de comprendre la mécanistique mise en place au niveau cellulaire en présence de bioactifs. Les fibroblastes sont donc des cibles directes des bioactifs à étudier pour des applications cosmétiques dans le cadre des stratégies de réparation cutanée et/ou anti-vieillessement.

## II. Modulation de l'activité cellulaire des fibroblastes en culture et de la synthèse des composants de la MEC dermique par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes

Dans la littérature, des études ont permis de démontrer que certaines molécules algales présentent des activités biologiques sur des fibroblastes, notamment les polysaccharides algaux (Yvin *et al.*, 1999 ; Senni *et al.*, 2006 ; Moon *et al.*, 2008 ; Rioux *et al.*, 2013 ; Ko *et al.*, 2013 ; Hwang *et al.*, 2017 ; Adrien *et al.*, 2017b ; Wang *et al.*, 2018 ; Pratoomthai *et al.*, 2020 ; Ozanne *et al.*, 2020) mais aussi les protéines et les peptides algaux (Ennamany *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 2017 ; Bodin *et al.*, 2020). À l'heure actuelle, peu d'études se sont focalisées sur la recherche d'une activité biologique de fractions poly- et oligosaccharidiques issues de la macroalgue *Ulva* sp. par EAE ou macération sur des fibroblastes dermiques humains.

La deuxième partie de ces travaux de thèse a concerné l'étude des activités biologiques des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes produites par macération et EAE, sur le métabolisme matriciel des fibroblastes dermiques humains.

### A. Stimulation de la prolifération des fibroblastes par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes

---

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux activités potentielles des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la prolifération des fibroblastes et à l'évaluation du potentiel cytotoxique de ces fractions. Cette partie de notre travail avait pour objectif de répondre aux questions suivantes :

- Les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sont-elles cytotoxiques pour les fibroblastes ?
- Quelles sont les concentrations de fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes susceptibles d'influencer la viabilité et la prolifération des fibroblastes en culture, et après combien de temps d'incubation ?
- Comment les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes modulent-elles la viabilité et la prolifération des fibroblastes dermiques humains ?

L'influence des fractions d'ulvanes sur les activités cellulaires des fibroblastes en culture a été déterminée par le test WST-1 et le test de la LDH. Ces deux tests complémentaires permettent d'évaluer la viabilité, la prolifération et la mortalité cellulaire des fibroblastes.

Ainsi, les doses établies pour lesquelles des effets sur la prolifération cellulaire sont visibles quelle que soit la fraction d'ulvanes, vont de 50 à 1000 µg/ml (50, 100, 250, 500 et 1000 µg/ml). Ces valeurs sont en accord avec celles mentionnées dans la littérature, que les polysaccharides soient extraits à partir d'*Ulva pertusa* (Ko *et al.*, 2013) ou *Ulva* sp. (Adrien *et al.*, 2017b), ou bien d'algues appartenant à d'autres phyla comme *Saccharina longicuris* (Moon *et al.*, 2008 ; Rioux *et al.*, 2013).

Dans la majorité des données de littérature évaluant l'activité de polysaccharides algaux sur les fibroblastes, les temps d'incubation d'étude sont de 24 h (Moon *et al.*, 2008, 2009 ; Rioux *et al.*, 2013) et 48 h (Senni *et al.*, 2006 ; Rioux *et al.*, 2013 ; Adrien *et al.*, 2017b ; Wang *et al.*, 2018). En effet, ces deux temps d'incubation sont couramment utilisés dans l'étude de la prolifération cellulaire en présence de bioactifs ainsi que dans l'évaluation de la néosynthèse protéique.

Nos résultats d'activité cellulaire traduisant la prolifération ont d'abord mis en évidence que la prolifération des fibroblastes était supérieure après 48 h d'incubation (jusque +68,2%) en comparaison à 24 h d'incubation (jusque +54,1%) en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. La stimulation de la prolifération cellulaire en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes est donc temps-dépendante avec de meilleurs résultats après 48 h d'incubation. Nos résultats ont montré que toutes les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes testées étaient capables d'augmenter la prolifération des fibroblastes dermiques humains, notamment après 48 h d'incubation à la concentration de 1000 µg/ml ( $p < 0,001$ ) de +33,4% à +68,2%.

Des études antérieures ont montré que des polysaccharides issus de l'algue *Ulva* pouvaient moduler la prolifération des fibroblastes (Senni *et al.*, 1998 ; Rioux *et al.*, 2013 ; Ko *et al.*, 2013 ; Cai *et al.*, 2016 ; Adrien *et al.*, 2017b). Cai *et al.* (2016) ont montré une augmentation de la prolifération des fibroblastes cutanés, ayant subi une lésion induite par le peroxyde d'hydrogène, en présence d'ulvanes bruts issus de l'algue *Ulva prolifera* jusque +54,4% à la concentration de 500 µg/ml. Ko *et al.* (2013) ont également montré que des ulvanes hydrolysés issus d'*Ulva pertusa*, à la concentration de 250 µg/ml, augmentent la prolifération de fibroblastes dermiques humains pré-sénescents (+30%) et sénescents (+50%), après 72 h d'incubation. De la même manière, en s'intéressant aux algues brunes, des fractions de polysaccharides sulfatés riches en fucose (fucose : 44% et sulfates : 28%) de hauts PM (> 100 kDa) et bas PM (< 30 kDa) obtenues par hydrolyse acide ou dépolymérisation radicalaire, à partir d'*Ascophyllum nodosum*, stimulent la prolifération de fibroblastes dermiques (de +41% après 1 j d'incubation à jusque +56% après 4 j d'incubation avec 10 µg/ml de fucanes) (Senni *et al.*, 1998). De même les polysaccharides sulfatés, issus de l'algue *Sargassum fusiforme* par EAE avec l'enzyme Celluclast® suivie d'une précipitation éthanolique, augmentent la prolifération de fibroblastes dermiques humains de 20 à 40% aux concentrations testées de 25, 50 et 100 µg/ml après 48 h d'incubation (Wang *et al.*, 2018). Nos résultats sont donc en accord avec ces données de littérature.

Toutefois, Rioux *et al.* (2013) ont montré que des extraits bruts de galactofucanes de *S. longicuris* de 1529 et 638 kDa à 1000 µg/ml induisent une diminution significative ( $p < 0,01$ ) de la prolifération *via* un comptage de cellules, mais que des extraits dépolymérisés par hydrolyse radicalaire (< 10 kDa) à la même concentration stimulent significativement ( $p < 0,05$ ) la prolifération après 6 jours d'incubation. Une autre étude a mis en évidence que les ulvanes bruts (57 kDa) d'*Ulva* sp. aux concentrations de 10, 100 et 500 µg/ml diminuent de manière significative la prolifération des fibroblastes après 48 h d'incubation. Dans cette même étude, les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide sur résine échangeuses d'ions (4 kDa) ne limitent la prolifération des fibroblastes qu'à la concentration de 500 µg/ml (Adrien *et al.*, 2017b). Les études de Rioux *et al.* (2013) et d'Adrien *et al.* (2017b) permettent

de mettre en évidence que des fractions de polysaccharides algaux bruts peuvent diminuer la prolifération des fibroblastes tandis que des fractions dépolymérisées peuvent ne pas modifier voire même augmenter leur prolifération. Ces travaux sont donc partiellement en accord avec notre étude puisque nous avons montré une stimulation de la prolifération des fibroblastes en présence de fractions d'ulvanes à la fois non dépolymérisés et dépolymérisés après 24 h et 48 h d'incubation.

D'autre part, nos résultats concernant l'activité des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes de par leur composition riche en rhamnose (près de 50% de la teneur en sucres totaux), peuvent être rapprochés des travaux d'Andrès *et al.* (2006) sur les effets de poly- et oligosaccharides riches en rhamnose sur des fibroblastes. En effet, les auteurs ont montré qu'un polysaccharide (nommé RROP-1) de 50 kDa riche en rhamnose (Rha, 50 à 60%), galactose (Gal) et acide glucuronique (GlcA) et les oligosaccharides obtenus par hydrolyse acide de celui-ci, issus de la bactérie *Klebsiella pneumoniae*, stimulent significativement ( $p < 0,001$ ) la prolifération de fibroblastes de 40 à 80%. La teneur en rhamnose des fractions polysaccharidiques semble donc être déterminante dans la stimulation de la prolifération des fibroblastes.

De plus, les travaux d'Andrès *et al.* (2006) suggèrent que le site de reconnaissance de l' $\alpha$ -L-rhamnose est un récepteur spécifique, plus précisément une lectine membranaire, protéine de liaison au glucide. Cette lectine qui a été détectée en premier sur les kératinocytes humains (Cerdan *et al.*, 1991) serait également présente au niveau des fibroblastes cutanés humains (Andrès *et al.*, 2006). Faury *et al.* (2008) ont confirmé ces résultats et ont également montré la fonction de récepteur/transducteur de signal d'une lectine reconnaissant le rhamnose *via* l'induction dose-dépendante de la concentration en ion calcium initiale et de l'expression de gènes des fibroblastes dermiques humains en présence de RROP-1 et de L-rhamnose seul. Ainsi, nos fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes enrichies en rhamnose pourraient être reconnues au niveau d'une lectine membranaire des fibroblastes dermiques humains permettant un effet modulateur des réponses biologiques de ces cellules *via* une transduction du signal et aboutissant à une stimulation de la prolifération cellulaire.

Par ailleurs, nos résultats d'activité cytotoxique *via* le dosage de la LDH ont montré qu'après 24 h et 48 h d'incubation, de manière générale, les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes ne présentent pas d'activité cytotoxique sur les fibroblastes. Néanmoins, les rares fractions présentant une cytotoxicité significativement plus élevée que le contrôle stimulent de manière significative ( $p < 0,05$ ) la prolifération des fibroblastes d'environ 40%. La potentielle cytotoxicité de ces fractions aux concentrations testées n'est donc pas corrélée à une diminution de la viabilité des fibroblastes. Des études antérieures ont déjà montré que les ulvanes sont des composés non cytotoxiques sur différents types cellulaires comme les macrophages (Tabarsa *et al.*, 2012, 2018 ; Peasura *et al.*, 2016), les cellules intestinales (Berri *et al.*, 2017), les fibroblastes (Alves *et al.*, 2013c) et les cellules Vero (Morán-Santibañez *et al.*, 2016).

Les résultats obtenus sur le caractère non cytotoxique des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. sont donc en accord avec ces données. Ainsi, les fibroblastes utilisés dans cette étude peuvent être mis en contact avec les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes produites au préalable dans les concentrations testées.

## B. Modulation de la synthèse des composants de la MEC par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes

---

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux activités potentielles des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp. par macération ou EAE sur la synthèse *in vitro* des composants de la MEC par des fibroblastes dermiques humains.

L'hypothèse de départ était que ces fractions peuvent influencer la synthèse de ces composants matriciels dermiques.

Ainsi, nous avons voulu analyser les effets potentiels des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes aussi bien sur la voie anabolique que sur la voie catabolique matricielle. De ce fait, l'expression et la synthèse des collagènes, notamment type I et III, *via* l'étude de leurs niveaux protéiques et de leurs niveaux moyens d'expression des ARNm, ont été analysées sur des fibroblastes cultivés en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. Le collagène de type I est un constituant important de la MEC, et représente le collagène le plus abondant du derme (Meigel *et al.*, 1977). Le collagène de type III, est également un collagène majeur retrouvé dans le derme, plus présent dans les peaux jeunes en comparaison avec les peaux matures (Varani *et al.*, 2006 ; Rong *et al.*, 2008). Il intervient également dans des processus de réparation tissulaire et lors de la cicatrisation des plaies (Merkel *et al.*, 1988 ; David-Raoudi *et al.*, 2008). D'autres molécules comme les glycosaminoglycanes (GAG), apparaissent comme des éléments constitutifs majeurs de la MEC (Smith & Melrose, 2015). L'analyse des effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la synthèse de ces GAG était donc également importante.

Les MMP sont des protéases, largement impliquées dans la voie catabolique, qui dégradent notamment le collagène (Van Doren, 2015). Les TIMP représentent les inhibiteurs naturels de ces MMP (Arpino *et al.*, 2015). Nous nous sommes donc également intéressés à étudier les effets de ces fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression de la MMP-1, intervenant dans la voie catabolique matricielle en dégradant le collagène de type I, et du TIMP-1, son inhibiteur. Ceci a été réalisé *via* l'étude de leurs niveaux protéiques et de leurs niveaux moyens d'expression des ARNm.

Enfin, d'un point de vue mécanistique préliminaire, nous avons analysé les effets potentiels des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la voie du TGF- $\beta$ 1 *via* l'étude du niveau moyen d'expression de ses ARNm et l'étude des niveaux moyens d'expression des ARNm de *SMAD2/3* et *SMAD4*. Les SMAD sont des facteurs *trans* intervenant notamment en amont du promoteur de *COL1A1* permettant sa transcription (Piek *et al.*, 1999). Nous nous sommes également intéressés à la voie de NF- $\kappa$ B, facteur *trans* pro-inflammatoire intervenant également en amont du promoteur de *COL1A1* ayant un rôle inhibiteur sur sa transcription (Bigot *et al.*, 2012) et stimulant par ailleurs la transcription des ARNm de *MMP-1* (Bond *et al.*, 1999). Une attention particulière a été portée à l'étude du niveau moyen d'expression des ARNm d'une de ses sous-unités : *p65*.

## 1. Stimulation de la voie anabolique matricielle par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues d'*Ulva* sp., sur la synthèse des composants intervenant dans la voie anabolique de la MEC, c'est-à-dire principalement les GAG et collagènes de type I et III.

Les résultats ont mis en évidence une augmentation significative ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ ) de la synthèse des GAG sulfatés (+38,7 à +50,6%) et non sulfatés (+38,2 à +57,3%) en présence des fractions d'ulvanes, notamment à la concentration de 1000 µg/ml. Les GAG sulfatés détectés sont des dermatanes sulfates, GAG majoritaires du derme, des héparanes sulfates ou bien des chondroïtines sulfates. Les GAG non sulfatés détectés doivent correspondre majoritairement à l'acide hyaluronique (Hedman *et al.*, 1979 ; Silbert *et al.*, 1986 ; Fischer, 1996 ; Siméon *et al.*, 2000 ; Isnard *et al.*, 2004 ; Adrien *et al.*, 2017b ; Latire *et al.*, 2017). Ceux-ci s'associent à des protéines afin de former des protéoglycanes (PG) pouvant être la décorine ou le versicane par exemple (Kinsella *et al.*, 2004). Ces PG interagissent notamment avec le collagène de type I afin d'établir un réseau moléculaire permettant l'assemblage de la MEC (Chen *et al.*, 2020).

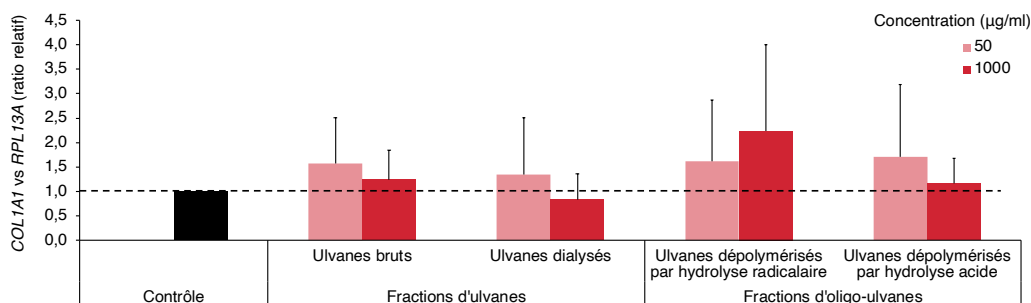
Une étude précédente a été menée par Adrien *et al.* (2017b) concernant la stimulation de la production d'acide hyaluronique par les fibroblastes en présence de fractions d'ulvanes de différents poids moléculaires. Les auteurs ont noté une stimulation dose-dépendante de la production d'acide hyaluronique en présence d'ulvanes bruts et dépolymérisés sur résine échangeuse d'ions. Néanmoins, ils indiquent une baisse de la production d'acide hyaluronique par les ulvanes dépolymérisés en comparaison avec les ulvanes bruts. Deux autres études ont montré que des polysaccharides sulfatés (ou non) riches en fucose augmentent la production de GAG sulfatés, l'héparane sulfate, le kératane sulfate et le dermatane sulfate, par les fibroblastes dermiques humains (Isnard *et al.*, 2004 ; Ivanov *et al.*, 2016). Ainsi, nos résultats vont dans le sens de ceux obtenus dans ces études.

Nous avons ensuite analysé les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression du collagène de type I au niveau transcriptionnel. Les résultats de notre étude ont mis en évidence qu'après 48 h d'incubation, les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes diminuent le niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* codant pour la chaîne collagénique  $\alpha 1$ . Cette diminution est particulièrement démontrée à la concentration de 1000 µg/ml avec un facteur de 1,6 à 3,2 ( $p < 0,01$ ). Concernant le niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A2*, qui code pour la chaîne collagénique  $\alpha 2$ , les ulvanes dialysés issus de macération et les fractions d'oligo-ulvanes obtenues par macération et EAE semblent être les seules diminuant leur expression (diminution d'un facteur 1,3 à 1,5 à la concentration de 1000 µg/ml).

La littérature s'accorde à dire que normalement ces gènes sont exprimés de manière coordonnée puisqu'ils codent pour les deux sous unités du collagène de type I (Vuorio & De Crombrugge, 1990).

L'étude de Faury *et al.* (2008) montre que RROP1 (50 kDa, utilisé dans les travaux d'Andrès *et al.*, 2006), constitué plus précisément d'un pentasaccharide riche en Rha, Gal et GlcA, diminue le niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* de 20% par rapport au contrôle, après 48 h d'incubation avec les fibroblastes, ce qui est en accord avec notre observation.

Néanmoins, nos résultats ont mis en évidence, qu'après 48 h d'incubation, le niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* était diminué en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes mais qu'au niveau protéique, une augmentation de la synthèse de collagène de type I était induite. Nous pouvons supposer que cette différence est en lien avec un rétrocontrôle négatif de la synthèse de collagène de type I de manière temps-dépendante. En effet, le temps de demi-vie d'un ARNm de *COL1A1* est relativement court, de 2 à 24 h maximum selon le type cellulaire (Dhawans *et al.*, 1991 ; Eckes *et al.*, 1996), en comparaison avec l'unité fonctionnelle (la protéine) qui a un temps de demi-vie beaucoup plus long de 30 à 60 jours (Stefanovic, 2013). Un résultat préliminaire après 24 h d'incubation des fibroblastes en présence des fractions d'ulvanes et oligo-ulvanes (Figure 115) ne met en évidence aucune différence significative du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* en comparaison avec le contrôle. Ainsi, nous supposons qu'une régulation positive du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* pourrait avoir lieu précocement, avant 24 h, permettant ainsi d'augmenter la synthèse de collagène de type I au niveau protéique en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. Tandis qu'à 48 h un rétrocontrôle négatif s'effectue afin d'éviter une sur-accumulation de collagène de type I synthétisé qui conduirait ainsi à un phénomène de fibrose (Trojanowska *et al.*, 1998).



**Figure 115 : Effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva sp.* par EAE, aux concentrations de 50 et 1000 µg/ml, sur le niveau d'expression des ARNm de *COL1A1* de fibroblastes dermiques humains en culture après 24 h d'incubation**

Les niveaux d'expression des ARNm sont normalisés en utilisant le gène *RPL13A* et exprimés en ratio relatif par rapport au contrôle. Les valeurs sont les moyennes ± erreur standard,  $n=3$  (fibroblastes issus de sujets âgés de 30 et 43 ans).

*A contrario*, d'autres études ont montré une stimulation de l'expression au niveau transcriptomique et protéomique du collagène de type I par des fibroblastes irradiés aux UVB en présence de polysaccharides algaux. En effet, plusieurs études ont montré qu'une augmentation du niveau moyen d'expression des ARNm du procollagène de type I était corrélée à une augmentation de sa synthèse protéique par les fibroblastes (Hs68), irradiés aux UVB, en présence de polysaccharides sulfatés riches en fucose de hauts et bas poids moléculaires aux concentrations de 1, 10, 100 et 500 µg/ml (Moon *et al.*, 2008, 2009 ; Hwang *et al.*, 2017).



En effet, même s'il est primordial d'analyser les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'expression du collagène de type I au niveau transcriptionnel, il a semblé essentiel de s'intéresser à l'unité fonctionnelle : la protéine. Au niveau du collagène total, nos résultats ont d'abord mis en évidence que les fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et dialysés), et d'oligo-ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire à la concentration de 1000 µg/ml, augmentent significativement sa synthèse de l'ordre de 20%. Ces résultats ont notamment démontré une augmentation de la synthèse de procollagène de type I par les fibroblastes en culture de manière significative lorsque ces derniers sont exposés aux fractions d'ulvanes (jusque +94,9% avec  $p < 0,01$  et jusque +217% avec  $p < 0,05$ ) et non significative lorsqu'ils sont exposés aux fractions d'oligo-ulvanes à la concentration de 1000 µg/ml. La synthèse de collagène de type I mature par les fibroblastes en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes est augmentée de manière non significative (jusque +112,3% à 115,3% en présence des ulvanes dialysés).

Nos résultats montrent une augmentation du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL3A1* en présence des ulvanes bruts ( $p < 0,05$ , facteur 2,3) et dialysés (facteur 1,8 maximum,  $p < 0,05$ ), et des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire (NS, facteur 1,2) et acide ( $p < 0,05$ , facteur 1,2), notamment à la concentration de 1000 µg/ml. Nous nous sommes également intéressés ensuite à son expression au niveau protéique. Nous avons démontré une augmentation non significative de la synthèse de collagène de type III par les fibroblastes en culture lorsque ces derniers sont incubés avec les ulvanes bruts (UM : +125,0% et UE : +144,2%) et les ulvanes dialysés (DS-UM : +225,7% et DS-UE : +485,7%).

Nos observations sont en accord avec plusieurs études menées sur les fibroblastes en présence de poly- ou oligosaccharides algaux (Senni *et al.*, 1998 ; Rioux *et al.*, 2013 ; Ko *et al.*, 2013). Une étude antérieure de 1998 de l'équipe de Senni a montré que sous l'effet de fractions riches en fucanes de hauts et bas PM, les fibroblastes tendent à synthétiser une matrice riche en collagène mais aussi en autres protéines (non présentées dans l'étude) ce qui limite le risque de fibrose. En effet, le pourcentage de protéines présentes dans la couche cellulaire est également augmenté (Senni *et al.*, 1998). D'autre part, Rioux *et al.* (2013) ont montré que des fractions de galactofucanes dépolymérisées par hydrolyse radicalaire (< 10 kDa), issues de l'algue *Saccharina longicuris*, augmentent de manière dose-dépendante la sécrétion de collagène de type I mature par les fibroblastes après 6 j de traitement. Néanmoins, les auteurs montrent également que les fractions de galactofucanes bruts, c'est-à-dire non dépolymérisées, n'ont aucun effet significatif sur la sécrétion de collagène de type I (Rioux *et al.*, 2013). Ce dernier résultat rejoint les travaux d'Adrien *et al.* (2017b) qui, contrairement à notre étude, ne mettent pas en évidence de stimulation de la synthèse de collagène total en présence d'ulvanes bruts et dépolymérisés.

Toutefois, Ko *et al.* (2013) montrent qu'un extrait polysaccharidique hydrolysé issu d'*Ulva pertusa*, aux concentrations de 100 et 250 µg/ml, augmente la synthèse de procollagène de type I par des fibroblastes pré-sénescents et sénescents, ce qui à l'inverse de nos travaux est corrélé à une augmentation du niveau moyen d'expression de ses ARNm.



D'autre part, nos résultats sont en accord avec deux autres études portant sur des fibroblastes exposés à des polysaccharides riches en rhamnose (Andrès *et al.*, 2006) ou du rhamnose seul (Pageon *et al.*, 2019). Pour rappel, le rhamnose est le monosaccharide majoritaire de nos fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, représentant près de 50% des sucres totaux. En 2006, Andrès *et al.* ont montré qu'un polysaccharide de 45 kDa (nommé RROP-2) riche en rhamnose (Rha, 50 à 60%), acide glucuronique (GlcA) et glucose (Glc) ainsi que son oligosaccharide obtenu par hydrolyse acide (RROP-3 de 5 kDa), issus de la bactérie *Klebsiella planticola*, augmentent la synthèse de collagène total de 20% (Andrès *et al.*, 2006). Une autre étude a montré que RROP-3 stimule plus particulièrement la synthèse de collagène de type I (Ravelojaona *et al.*, 2008). Toutefois, en s'intéressant au polysaccharide RROP-1 et à l'oligosaccharide obtenu par hydrolyse acide de ce dernier (RROP-4), tous les deux riches en Rha, Gal et GlcA, les auteurs mettent en évidence une stimulation de la synthèse de collagène total uniquement par l'oligosaccharide RROP-4 (+40%) (Andrès *et al.*, 2006). Plus récemment, une étude menée par Pageon *et al.* (2019) a montré que le rhamnose augmente la production et le dépôt de collagène de type I au niveau du derme, *in vitro* sur des équivalents de peaux reconstruites (kératinocytes différenciés adhérents sur un derme équivalent contenant des fibroblastes et une matrice riche en collagène) et *in vivo* sur des biopsies de peaux après 8 semaines d'applications (mis en évidence par immunomarquage).

Ainsi, le fait que les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes puissent augmenter la synthèse de collagènes de type I et III, mais aussi de GAG, est intéressant dans le cadre d'applications potentielles dans un contexte de réparation cutanée ou anti-vieillessement. Enfin, ces résultats sont à mettre en corrélation avec une augmentation de la prolifération des cellules. Il apparaît donc que les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes agissent sur la différenciation des fibroblastes.

## **2. Stimulation de la voie catabolique matricielle par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes**

Nos résultats ont permis de mettre en évidence une augmentation de la voie anabolique matricielle, avec notamment une augmentation de la synthèse de collagènes. Néanmoins, il est important de noter que nos résultats mettent également en évidence une augmentation de la synthèse de la MMP-1, et cela, en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. Cette augmentation se traduit par une stimulation du niveau moyen d'expression des ARNm de *MMP-1* (facteur 8,7 à 32,0), par une augmentation protéique du taux de la MMP-1 (+52,8 à +420,6%) mais aussi une amplification de son activité enzymatique (+38,6 à +50,3%) au niveau des fibroblastes dermiques humains après 48 h d'incubation.

Cette MMP-1 appartient à la famille des collagénases. La stimulation de la synthèse et de l'activité de la MMP-1 entraîne généralement une diminution de la quantité de collagène. Cependant, au niveau protéique, nos résultats ne permettent pas de mettre en évidence une telle diminution. En effet, même si nos fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes stimulent la synthèse de la MMP-1, elles augmentent également la synthèse de collagène, comme présenté précédemment.

Ainsi, il semble finalement que la balance anabolique/catabolique soit en faveur d'une synthèse collagénique malgré une stimulation de la MMP-1 endogène active.

De plus, les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes tendent à ne pas modifier voire à augmenter le niveau moyen d'expression des ARNm de *TIMP-1* (facteur 1,29 en présence des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire issus de macération). Au niveau protéique, nous avons déterminé, que de la même façon, la production du TIMP-1 n'était pas significativement modifiée en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'hydrolyse acide, mais qu'elle était significativement augmentée en présence des fractions d'oligo-ulvanes issues de l'hydrolyse radicalaire (DEP-HD PP-UM : +59,1% et DEP-HD PP-UE : +96,3%). Le TIMP-1, l'inhibiteur naturel de la MMP-1, permet ainsi de diminuer la dégradation du collagène par la MMP-1 *via* l'augmentation de la production du TIMP-1. Nos travaux ont mis en évidence que les ulvanes dépolymérisés et notamment ceux obtenus par hydrolyse radicalaire entraînent une augmentation de la néosynthèse du TIMP-1 qui peut être corrélée à une synthèse plus faible de la MMP-1 en comparaison avec les autres fractions.

Les travaux de Rioux *et al.* (2013) ont montré que des galactofucanes bruts sulfatés au niveau de l'unité fucopyranose, augmentent l'activité spécifique de la MMP-1, sans que la sécrétion de collagène de type I ne soit modifiée. Nos résultats sont donc partiellement en accord avec ces travaux puisque dans notre étude les synthèses des collagènes de type I et III, et de la MMP-1 sont stimulées de façon concomitante en présence des fractions d'ulvanes. Une autre étude a montré que des ulvanes hydrolysés issus d'*Ulva pertusa* diminuent le niveau moyen d'expression des ARNm de *MMP-1* et la sécrétion de la MMP-1 par des fibroblastes sénescents (Ko *et al.*, 2013). Ainsi, l'étude sur la synthèse MMP-1 de fibroblastes sénescents en présence de nos fractions d'oligo-ulvanes pourrait être une voie à investiguer.

Néanmoins, dans la littérature, d'autres études ont démontré, comme dans nos travaux, une augmentation concomitante de collagène de type I et de MMP en présence de polysaccharides algaux (Ayoub *et al.*, 2015) ou de polysaccharides riches en rhamnose (Andrès *et al.*, 2006). En effet, la laminarine, issue de *Saccharina longicuris*, à 10 µg/ml entraîne l'augmentation significative de la synthèse de collagène de type I par les fibroblastes dermiques humains après 7 j d'incubation (augmentation d'un facteur 8,6) mais également par un derme reconstruit après 35 j d'incubation (facteur 4 à 12). L'activité de MMP dont celle de la MMP-1 par le derme reconstruit est également significativement augmentée en présence de laminarine à 5 et 10 µg/ml (Ayoub *et al.*, 2015). Une autre étude a également montré une stimulation concomitante de la synthèse de collagène et une stimulation de l'expression de MMP, comme MMP-9, en présence d'un oligosaccharide (RROP3 : 5 kDa) riche en Rha, GlcA et Glc (Andrès *et al.*, 2006).

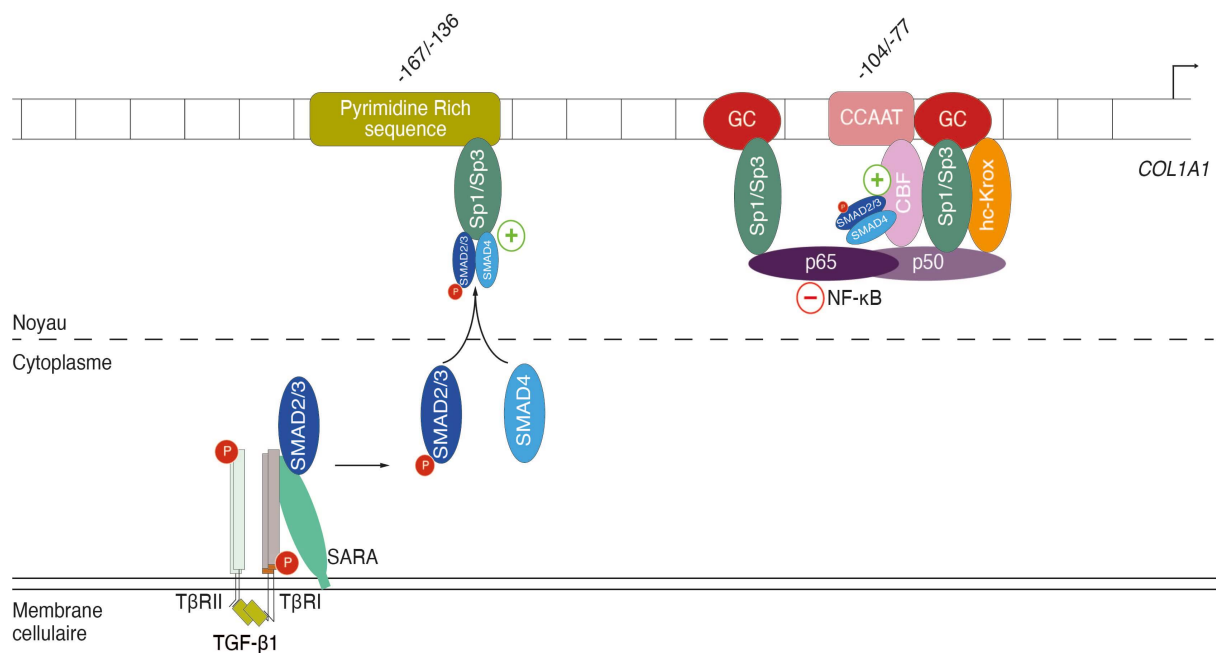
Les travaux de Faury *et al.* (2008, 2011), qui ont confirmé l'existence d'une lectine membranaire se liant au rhamnose de polysaccharides, permettent de compléter ces travaux et de valider l'hypothèse de coopération entre une lectine se liant au rhamnose et les voies de régulation contrôlant la prolifération cellulaire, la biosynthèse du collagène et l'expression de MMP (Andrès *et al.*, 2006 ; Ravelojaona *et al.*, 2008 ; Faury *et al.*, 2008, 2011).

Ainsi, dans nos travaux, nous supposons que la liaison des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes riches en rhamnose à une lectine membranaire des fibroblastes permet par la suite de stimuler la prolifération cellulaire, la synthèse des collagènes et de la MMP-1. Ozanne *et al.* (2020) ont montré l'augmentation significative de l'interaction avec la lectine Wheat Germ Agglutinin, reconnaissant les résidus *N*-acétyl-D-glucosamine et acide-*N*-acétylneuraminique, en présence de laminarine à 100 µg/ml. De façon analogue à leurs travaux, l'étude de GLYcoPROFILES® des fibroblastes à l'aide de la technologie GLYcoDiag® en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes pourrait être réalisée pour l'identification de la lectine (récepteur) impliquée dans la liaison du rhamnose (Ozanne *et al.*, 2020). La différence d'activité entre les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes pourrait reposer sur des voies métaboliques différentes selon la séquence de monosaccharides des fractions, leur sulfatation et leur poids moléculaire (Faury *et al.*, 2011 ; Rioux *et al.*, 2013 ; Adrien *et al.*, 2017b).

Par ailleurs, l'augmentation de la synthèse et l'activité de la MMP-1 en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes est intéressante dans le cadre de la réparation tissulaire. En effet, lors d'une blessure cutanée, la réparation tissulaire, faisant suite à l'inflammation, implique la formation d'un tissu de granulation, suivie d'un remodelage tissulaire qui s'opère *via* l'intervention des MMP.

### 3. Étude préliminaire des voies du TGF-β et de NF-κB : quelle voie semble activée ou inhibée par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes ?

Au vu de nos précédents résultats, nous nous sommes attachés à investiguer les potentiels mécanismes mis en jeu pour induire la régulation de la transcription de *COL1A1* et la synthèse de collagène, ainsi que la régulation de la transcription de *MMP-1* et sa synthèse par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes.



**Figure 116 : Schéma simplifié de l'action des voies de signalisation du TGF-β1 et de NF-κB au niveau du promoteur proximal de *COL1A1***

+ : facteur *trans*activateur, - : facteur *trans*inhibiteur

Nous nous sommes donc d'abord intéressés à la voie du TGF- $\beta$ 1, facteur pro-fibrosant connu pour la promotion de la transcription du gène *COL1A1*. Les effets du TGF- $\beta$  sont transmis *via* les facteurs *trans* Sp1 et Sp3 au niveau du promoteur proximal de *COL1A1* (Figure 116), notamment sur des sites de liaison en -164/-122 pb (Jimenez *et al.*, 1994 ; Chen *et al.*, 1998 ; Gaidarova & Jiménez, 2002) mais également *via* CBF (Lindahl *et al.*, 2002). Les SMAD2/3, ligands spécifiques des récepteurs transmembranaires du TGF- $\beta$ 1, sont ceux qui sont principalement phosphorylés lors d'une stimulation par le TGF- $\beta$ 1. Ils sont ensuite libérés de la protéine d'ancrage SARA (« Smad Anchor for Receptor Activation ») afin de s'associer à SMAD4. Ils sont alors rapidement transloqués dans le noyau où ils se lient en amont du promoteur des gènes *COL1A1* et *COL1A2* *via* des facteurs *trans* comme Sp1 (Chen *et al.*, 1999 ; Sysa *et al.*, 2009 ; Massagué, 2012).

Pour l'étude préliminaire de la voie du TGF- $\beta$ 1, nous avons donc étudié les niveaux moyens d'expression des ARNm de *TGF- $\beta$ 1* et des *SMAD2/3* et *4*, en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes après 48 h d'incubation.

Nos résultats ont montré que les fractions d'ulvanes diminuent le niveau moyen d'expression des ARNm de *TGF- $\beta$ 1* (facteur 1,9 à 3,1). Ainsi, la baisse de transcription du *TGF- $\beta$ 1* en présence des fractions d'ulvanes pourrait entraîner la diminution du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* après 48 h d'incubation avec les fibroblastes. Par ailleurs, l'étude du niveau moyen d'expression des ARNm des *SMAD* a montré que les fibroblastes incubés avec les ulvanes bruts issus de macération diminuent significativement le niveau moyen d'expression de *SMAD3* (facteur 1,3) alors que la fraction issue d'EAE diminue significativement celui de *SMAD4* (facteur 2,0). La diminution du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* après 48 h en présence des ulvanes bruts peut donc être à la fois corrélé à la diminution du niveau moyen d'expression des ARNm de *TGF- $\beta$ 1* et à celle du niveau moyen d'expression des ARNm de *SMAD3* et *SMAD4*. Ce résultat est en accord avec les travaux de Purohit *et al.* (2016) qui ont démontré que le niveau moyen d'expression des ARNm de procollagène de type I était réduit en présence de siARN dirigés contre *SMAD3* et *SMAD4*, mais pas en présence de siARN dirigés contre *SMAD2*.

Toutefois, ceci n'est pas valable dans notre étude en présence des ulvanes dialysés où aucune variation significative du niveau moyen d'expression des ARNm de *SMAD2/3* et *4* n'est observée, ni en présence des fractions d'oligo-ulvanes où une augmentation parfois significative est observée. Il semblerait qu'en présence de ces fractions, un autre mécanisme soit donc mis en jeu entraînant la diminution du niveau moyen d'expression des ARNm de *COL1A1* après 48 h d'incubation.

Ainsi, nous supposons dans notre étude que la limitation de la transcription des gènes *COL1A1*, *TGF- $\beta$ 1*, et éventuellement *SMAD2/3* et *4* après 48 h d'incubation soit le résultat d'un rétrocontrôle négatif suite à l'augmentation de la synthèse protéique de collagène de type I au niveau des fibroblastes. Wiestner *et al.* (1979) proposent que les propeptides libres du collagène de type I sont impliqués dans la régulation de sa synthèse par un rétrocontrôle négatif par les fibroblastes en culture. Toutefois, le mécanisme de ce rétrocontrôle n'a pour l'instant pas été élucidé (Bou-Gharios *et al.*, 2019).

Par ailleurs, Baugé *et al.* (2011) ont montré l'existence d'une boucle de rétrocontrôle des réponses du TGF- $\beta$  dans des chondrocytes arthrosiques humains. Cette limitation de la transcription des gènes serait intéressante pour notre étude dans le cadre de prévention de fibrose dermique ou de renouvellement matriciel (Wong, 2015).

Nous nous sommes ensuite intéressés de façon préliminaire à la voie de NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription comportant cinq membres pouvant s'associer pour former des homo- ou des hétéro-dimères : p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2), p65 (RelA), c-Rel et RelB. Une fois activé, NF- $\kappa$ B est largement connu pour initier l'expression de nombreux gènes de cytokines inflammatoires (IL-1, -2, -6, TNF- $\alpha$ ) et d'enzymes inflammatoires (cyclooxygénase, lipoxygénase) (Oak *et al.*, 2017). Par ailleurs, NF- $\kappa$ B est aussi connu pour augmenter l'expression de la MMP-1 (Bond *et al.*, 1999). NF- $\kappa$ B intervient également dans la régulation négative du gène *COL1A1* *via* ses sous-unités p50 et p65 qui interagissent directement sur le promoteur proximal du gène avec les facteurs activateurs de la transcription Sp1, Sp3, hc-Krox ou CBF (Figure 116) (Rippe *et al.*, 1999 ; Beauchef *et al.*, 2012 ; Bigot *et al.*, 2012).

Pour l'étude préliminaire de la voie de NF- $\kappa$ B, nous avons donc, plus particulièrement, étudié le niveau moyen d'expression des ARNm de sa sous-unité p65. Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une modulation significative du niveau moyen d'expression des ARNm de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B. Nous ne pouvons donc pas conclure avec ce résultat préliminaire quant à l'activation de cette voie par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes pour l'augmentation de *MMP-1* ni la régulation négative de *COL1A1*. Des études ont montré qu'en présence de glucane (1  $\mu$ g/ml), les activités de liaisons des facteurs de transcription étaient temps-dépendantes. En effet, les activités de liaisons d'AP-1 et NF- $\kappa$ B sont augmentées à des intervalles de temps précoces (1, 2, 4, 8 et 12 h) tandis que celles de NF-1 et Sp1 sont augmentées à des intervalles de temps ultérieurs (8, 12, 24, 36 et 48 h), la dernière étant corrélée à la biosynthèse de collagène dans les fibroblastes dermiques humains (Kougias *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2002a, b). Nous supposons que de la même manière la régulation de l'expression des ARNm de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B pourrait être temps-dépendante. Par ailleurs, d'autres voies de signalisation comme la voie des MAPK avec ERK 1/2, p38, JNK ou la voie de PI3K-Akt pourraient être impliquées dans la régulation de l'expression de MMP dont MMP-1 (Reunanen *et al.*, 2002), dans la régulation de la synthèse de collagène de type I *via* les récepteurs TGF- $\beta$  (Suto *et al.*, 2019) ou le recrutement de facteur *trans*activateurs comme Sp1 ou Sp3 au niveau du promoteur de *COL1A1* (Park *et al.*, 2012). À titre d'exemple, Wang *et al.* (2018, 2021) ont étudié les effets de polysaccharides sulfatés riches en fucose issus de *Sargassum fusiforme* sur les différentes voies de signalisation de fibroblastes dermiques humains irradiés aux UVB, au niveau transcriptomique et protéomique. Pour cela, ils ont considéré la voie de NF- $\kappa$ B *via* l'étude de l'expression des sous-unités p50 et p65, mais aussi la voie des MAPK *via* l'étude de la phosphorylation d'AP-1, p38, JNK et ERK. Les auteurs ont montré que les polysaccharides sulfatés riches en fucose augmentent la synthèse de collagène et suppriment l'expression de MMP des fibroblastes irradiés par les UVB en réduisant à la fois l'activation de NF- $\kappa$ B (diminution de l'expression de p65 et p50) mais aussi l'activation de la voie des MAPK (diminution de l'expression d'AP-1, p-38, JNK et ERK phosphorylés) aux niveaux transcriptomique et protéomique.

Il serait intéressant d'étudier les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'activité de liaison de NF- $\kappa$ B *via* ses sous-unités p65 et p50 mais aussi de l'AP-1 à divers temps d'incubation avec les fibroblastes.

Il est également envisageable que les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes stimulent la synthèse de cytokines pro-inflammatoires connues pour augmenter la synthèse de MMP comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1.

Notre étude a permis de mettre en évidence des effets biologiques de poly- et oligosaccharides sulfatés algaux issus de l'algue proliférative *Ulva* sp. sur la synthèse matricielle (collagènes de type I et III, GAG) ainsi que la synthèse de la MMP-1 de fibroblastes dermiques humains. Ainsi, les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes semblent être intéressantes dans le cadre d'un renouvellement matriciel. Toutefois, notre étude devra être complétée et approfondie au niveau mécanistique puisque seulement des éléments de réponses préliminaires ont pu être apportés dans ce travail de thèse. L'ensemble des résultats suggère que des applications des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes pourraient être possibles en dermo-cosmétique dans le cadre de réparation tissulaire, de stratégie anti-vieillessement du derme, ou dans la prévention d'un phénomène de fibrose.

Les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues d'*Ulva* sp. présentant un potentiel d'application en dermo-cosmétique, il convenait de s'intéresser à leurs effets sur le microbiote cutané. En effet, en complément de l'équilibre de la MEC, le microbiote cutané, découvert plus récemment, est désormais reconnu comme un nouvel acteur essentiel au maintien de l'homéostasie cutanée.

### III. Modulation de la virulence bactérienne par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes

Fruit d'une mobilité de trois mois au sein du Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM - EA4312) de l'Université de Rouen-Normandie, la troisième partie de la thèse concerne l'étude des activités biologiques potentielles des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, issues de l'algue verte *Ulva* sp. par EAE, sur des souches bactériennes commensales du microbiote cutané. Ce microbiote cutané est intégré comme élément constitutif du système cutané. De par son importance, il est maintenant incontournable de s'y intéresser et d'assurer son intégrité. De plus, en accord avec le règlement européen 1223/2009, il est désormais primordial de s'assurer de l'absence d'effets indésirables d'actifs cosmétiques sur le microbiote cutané (Parlement Européen et du Conseil, 2009). Par ailleurs, au-delà de l'aspect réglementaire, le microbiote cutané étant encore en pleine phase exploratoire, peu d'actifs naturels et particulièrement algaux ont été testés sur ce microbiote.

Au cours de la préparation d'une revue bibliographique (Fournière *et al.*, 2020), il est rapidement apparu que parmi ce microbiote cutané, des espèces bactériennes, comme *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes*, existent sous forme de souches commensales qui sont en symbiose avec le système cutané.



Néanmoins, en réponse aux modifications du microenvironnement cutané (Mijouin *et al.*, 2013 ; N'Diaye *et al.*, 2016, 2017 ; Feuilloley, 2018 ; Gannesen *et al.*, 2018b ; Lesouhaitier *et al.*, 2019 ; Borrel *et al.*, 2019b ; Racine *et al.*, 2020), ces bactéries peuvent s'orienter vers un phénotype de pathogènes et voir leur activité de formation de biofilm et leur virulence modulées (Fitz-Gibbon *et al.*, 2013 ; Brandwein *et al.*, 2016).

### A. Influence sur *S. epidermidis* et *S. aureus* : deux staphylocoques commensaux

---

Dans un premier temps, nous avons donc évalué l'effet des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur deux souches bactériennes d'origine cutanée représentatives du microbiote commensal : *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03. En effet, *S. epidermidis* est l'espèce bactérienne la plus communément isolée de la peau humaine dont le rôle dans l'homéostasie cutanée a été largement montré (Cogen *et al.*, 2010b ; Skabytska & Biedermann, 2016). Plus récemment, l'espèce commensale *S. aureus* a montré *in vitro* et *in vivo* sa capacité à lutter contre une souche pathogène de *S. aureus*, résistante à la méthicilline, et donc *a fortiori* son implication dans l'homéostasie cutanée (Yang *et al.*, 2018).

Les résultats de notre étude ont mis en évidence que *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03 ne voient pas leurs croissances modifiées en présence des différentes fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à 1 mg/ml, et que ces fractions n'interfèrent pas avec le développement bactérien.

De la même façon, une étude a montré que les polysaccharides extraits de l'algue *Gracilaria* sp., testés aux concentrations de 0 à 25 mg/ml, ne présentent aucune activité d'inhibition de la croissance de *S. aureus* et *S. epidermidis* (souches de référence) par la méthode de diffusion par puits d'agar (Assaw *et al.*, 2018). Des extraits enrichis en polysaccharides issus de l'algue *Sargassum vachellianum* ne présentent aucune activité antibactérienne contre *S. aureus* par le test de diffusion sur gélose (Jesumani *et al.*, 2020). Aussi, Tran *et al.* (2018) ont montré que les ulvanes extraits de l'algue *Ulva reticulata* n'ont aucune activité antibactérienne contre *S. aureus*. Une autre étude de Freitas *et al.* (2020) a montré qu'un extrait aqueux de *Fucus spiralis*, enrichi en polysaccharides sulfatés, n'a aucun effet sur la croissance de *S. epidermidis* (DSM 1798). Par ailleurs, les travaux de Hillion (2013) et Gannesen *et al.* (2018c) ont montré que l'ingrédient PS291® (Téflose®), un polysaccharide dont la composition peut être rapprochée de celles des ulvanes, avec plus de 60% de rhamnose, du glucose, et de l'acide glucuronique, n'interfère pas avec la croissance bactérienne de *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03. Nos résultats sur la croissance des deux souches *S. epidermidis* et *S. aureus* en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sont donc en accord avec les données de la littérature qui portent à la fois sur des polysaccharides algaux et sur un polysaccharide riche en rhamnose.

De plus, nous avons montré, par microscopie confocale, que les fractions d'ulvanes de hauts poids moléculaires n'induisent pas de modification de la formation de biofilm par *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03, tandis que la fraction d'oligo-ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire, de plus bas poids moléculaire, favorise la formation de biofilm par *S. epidermidis* MFP04.

À notre connaissance, il n'y a pas d'étude s'intéressant aux effets de polysaccharides algaux sur la formation de biofilm du commensal *S. epidermidis*.

Néanmoins, les travaux de Hillion (2013) ont montré par la technique au cristal violet que le PS291<sup>®</sup>, diminue significativement la formation de biofilm de *S. epidermidis* MFP04 (Hillion, 2013). Gannesen *et al.* (2018c) ont démontré, par microscopie confocale également, l'inhibition du biofilm de *S. aureus* MFP03 par PS291<sup>®</sup> (Gannesen *et al.*, 2018c). Cependant, Hillion (2013) a également montré qu'un autre polysaccharide de haut poids moléculaire (2000 kDa) riche en acide galacturonique, L-fucose et glucose n'a aucun effet significatif sur la formation de biofilm de *S. epidermidis* MFP04. Ainsi, l'effet des polysaccharides sur la formation de biofilm de *S. epidermidis* MFP04 serait lié à leur composition en monosaccharides. Nos résultats vont donc dans le sens de ces données de littérature. De plus, l'étude de Hillion (2013) a aussi montré que l'oligorhamnose, de bas poids moléculaire, obtenu par hydrolyse du Rhamnosoft<sup>®</sup> (polysaccharide de 60 kDa riche en rhamnose, galactose et acide glucuronique) exerce un effet positif sur la formation de biofilm de *S. epidermidis* MFP04, ce qui est en accord avec notre résultat concernant la fraction d'oligo-ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire de bas poids moléculaire (7 kDa) et de composition monosaccharidique similaire.

Enfin, nous avons mis en évidence que les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes n'entraînent aucune modification significative de la cytotoxicité de *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03 sur les kératinocytes HaCaT.

À notre connaissance, il n'y a pas de travaux portant sur l'étude de la cytotoxicité induite par ces deux souches de staphylocoques sur les kératinocytes après culture bactérienne en présence de polysaccharides algaux. Toutefois, le résultat de notre étude est en accord avec les travaux de Hillion où le PS291<sup>®</sup>, riche en rhamnose, ne modifie pas la cytotoxicité de *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03 sur les kératinocytes HaCaT (Hillion, 2013).

Ainsi, ce travail montre que la croissance et la virulence des bactéries commensales *S. epidermidis* MFP04 et *S. aureus* MFP03 n'étant pas modifiées en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, celles-ci peuvent être utilisées dans le cadre de potentielles applications en cosmétique.

### **B. Influence sur *Cutibacterium acnes***

---

Bien que le microbiote cutané soit dominé par les bactéries du genre *Staphylococcus*, d'autres espèces sont également largement présentes comme *Cutibacterium*. Un certain nombre de travaux ont porté sur le rôle de *C. acnes* dans le développement de l'acné (Paugam *et al.*, 2017 ; Dagnelie *et al.*, 2018 ; Corvec *et al.*, 2019 ; Borrel *et al.*, 2019a, b).



Au niveau de la peau, les souches comme RT4 HL045PA1/HM-516 (phylotype IA<sub>1</sub>) sont largement associées à l'acné, tandis que les souches comme RT6 HL110PA3/HM-554 (phylotype II) sont retrouvées dans des zones de peau saine (Fitz-Gibbon *et al.*, 2013). Aussi, des études portant sur l'effet de composés modifiant la croissance, la virulence ou la formation de biofilm de souches de référence de *C. acnes* (Redoules *et al.*, 2010 ; Feuillolay *et al.*, 2016 ; Trompezinski *et al.*, 2016 ; Freitas *et al.*, 2020), de souches acnéiques et non acnéiques de *C. acnes* (Enault *et al.*, 2014 ; Ionescu *et al.*, 2015 ; Gannesen *et al.*, 2018c) ont déjà été menées.

Les résultats de notre étude ont mis en évidence que la souche acnéique *C. acnes* RT4 (HM-516) et la souche non acnéique *C. acnes* RT6 (HM-554) ne voient pas leurs temps de générations modifiés en présence des différentes fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes à 1 mg/ml.

Freitas *et al.* (2020) ont montré qu'un extrait aqueux de *Fucus spiralis* à 1 mg/ml, enrichi en polysaccharides sulfatés, stimule la croissance de *C. acnes* (DSM 1897). À l'inverse, Gannesen *et al.* (2018c) ont montré que le temps de génération de la souche RT4 n'était pas modifié en présence du polysaccharide riche en rhamnose PS291<sup>®</sup>, ce qui est en accord avec nos travaux. Toutefois, les résultats sur le suivi de croissance de la souche *C. acnes* RT6 n'ont été reproduits que deux fois ( $n=2$ ). En effet, cinq autres expérimentations de suivi de croissance de cette souche ont été tentées mais aucune n'a pu aboutir. Cette souche présente un caractère hydrophobe (Borrel *et al.*, 2019a), ce qui limite sa dispersion dans le milieu au cours des différents essais. Son ensemencement ne serait donc pas correctement effectué entraînant une absence de croissance. Afin de s'affranchir de cette difficulté, des essais utilisant un tensioactif comme le Tween dans le milieu RCM Polypeptone pourraient être envisagés.

Notre étude des effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur les souches bactériennes *C. acnes* RT4 et *C. acnes* RT6 révèle que pour une même fraction, les effets peuvent être multiples, par comparaison à ce qui est observé pour les staphylocoques. Notamment, les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire entraînent une diminution de la biomasse finale lors de la croissance de *C. acnes* RT4 mais n'ont aucun effet sur la croissance de RT6 et aucune activité antibiofilm sur les deux souches. L'effet des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide observé sur *C. acnes* RT4 et RT6 se traduit par une diminution de la formation de biofilm sans impact sur la croissance des souches.

Dans la littérature, les travaux d'Enault *et al.* (2014) sur une souche non caractérisée de *C. acnes*, et de Gannesen *et al.* (2018c) sur la souche acnéique RT4 de *C. acnes*, ont montré un effet inhibiteur de l'ingrédient PS291<sup>®</sup> (riche en rhamnose) sur la formation de biofilm en raison de propriétés potentiellement anti-adhésives. Gannesen *et al.* (2018c) ont également montré une modification de l'architecture du biofilm de RT4 suite au traitement avec le PS291<sup>®</sup>. Cette modification se caractérise, comme dans notre étude avec la fraction d'oligo-ulvanes obtenue par hydrolyse acide, par un biofilm plus mince.

Ainsi, nos résultats sont partiellement en accord avec les données de littérature puisque nous avons montré une activité antibiofilm d'une fraction d'oligo-ulvanes seulement contre *C. acnes* RT4 et RT6, et aucune activité de la part des autres fractions d'ulvanes. Cela pourrait éventuellement avoir un lien avec la désulfatation caractéristique de cette fraction qui serait alors plus active. Gadenne *et al.* (2015) ont montré que la meilleure surface antifouling contre *S. aureus* était celle fonctionnalisée avec un ulvane désulfaté. L'étude des effets de cette fraction d'oligo-ulvanes sur le processus d'adhésion initiale de *C. acnes* serait à investiguer.

Par ailleurs, dans le cadre de son implication dans la pathogénèse de l'acné, *C. acnes* a la capacité d'induire une inflammation au niveau des kératinocytes caractérisée par la sécrétion d'interleukines comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-8 ou le TNF- $\alpha$  (Nagy *et al.*, 2005 ; Beylot *et al.*, 2014 ; Cong *et al.*, 2019 ; Lee *et al.*, 2019). Aussi, les cellules HaCaT sont un modèle de différenciation *in vitro* fiable pour l'étude de réponses inflammatoires de kératinocytes humains (Colombo *et al.*, 2017).

Pour nos travaux, l'IL-8 a été utilisée comme marqueur de l'inflammation au niveau des kératinocytes HaCaT pour l'étude du potentiel inflammatoire des souches RT4 et RT6, préalablement cultivées avec les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. La sélection de cette interleukine repose sur son rôle dans l'initiation de l'inflammation dans la pathogénèse de l'acné puisqu'elle favorise la migration des neutrophiles vers les lésions inflammatoires (Nagy *et al.*, 2005 ; Abd El All *et al.*, 2007 ; Grange *et al.*, 2009 ; Borrel *et al.*, 2019a ; Yim *et al.*, 2020).

Les résultats de notre étude ont montré un potentiel inflammatoire de la souche acnéique RT4 supérieur (1051,17 pg/ml) à celui de la souche non acnéique RT6 (801,63 pg/ml) *via* le dosage d'IL-8 présente dans les surnageants de culture de kératinocytes HaCaT. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Borrel *et al.* (2019a) avec un niveau d'IL-8 de 1500 pg/mL induit par RT4 et 1050 pg/ml pour RT6.

De plus, dans nos travaux, les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes présentent un potentiel anti-inflammatoire *via* la diminution de la sécrétion par les kératinocytes d'IL-8 induite par *C. acnes* RT4 (-40% maximum) et RT6 (-58% maximum). L'activité anti-inflammatoire des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes s'expliquerait par la liaison des rhamnoses des ulvanes aux lectines des bactéries qui ne seraient alors plus disponibles pour l'adhérence des bactéries aux cellules (Lloyd *et al.*, 2007). Par ailleurs, au niveau cellulaire, la voie des MAPK est associée aux réponses inflammatoires des kératinocytes HaCaT induites par *C. acnes* (Nguyen *et al.*, 2018 ; Cheon *et al.*, 2019). Ainsi, dans notre étude, l'effet des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur *C. acnes* pourrait porter sur la diminution de la capacité de la bactérie à induire la phosphorylation de MAPK. Il serait donc intéressant d'approfondir notre étude et d'investiguer les voies de signalisation intracellulaires et les facteurs de transcriptions (NF- $\kappa$ B et AP-1 par exemple) impliqués dans la diminution de l'inflammation lorsque *C. acnes* est préalablement cultivée en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. Il serait également intéressant d'incuber les kératinocytes en présence des fractions puis de les infecter par *C. acnes* afin d'analyser si la réduction de l'inflammation (IL-8) est également observée et si cela entraîne une modulation de la voie des MAPK (Nguyen & Kim, 2020 ; Yim *et al.*, 2020).

Ainsi, dans le cas d'activité dermo-cosmétique de prévention de l'acné, l'utilisation des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide du fait de leur action antibiofilm contre *C. acnes*, mais également des fractions d'ulvanes (ulvanes bruts et dialysés) *via* leur potentiel anti-inflammatoire pourrait être envisagée.

Ces travaux ont permis d'étudier pour la première fois la réponse physiologique de bactéries d'origine cutanée *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes* en présence de fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue *Ulva* sp., obtenues par EAE. Ce travail a permis de mettre en évidence que ces fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sont sans risque pour le développement des bactéries commensales *S. epidermidis* et *S. aureus* mais également pour *C. acnes*.

Nos travaux suggèrent également que les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes ont un potentiel anti-inflammatoire, suite à l'inflammation induite par les souches de *C. acnes*. Cette activité biologique peut donc être intéressante dans le cas de la dysbiose de l'acné pour la restauration de l'homéostasie cutanée.

Toutefois, les techniques utilisées dans notre étude ont permis d'envisager seulement l'effet individuel des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur des bactéries étudiées séparément. Au niveau de la peau, les microorganismes forment une communauté qui interagit *via* des systèmes de communication comme le quorum sensing, ce qui influence la physiologie bactérienne. Ainsi, l'étude des effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur les bactéries cutanées, par des techniques de co-cultures et de modèles de colonisation *in vitro* sur des modèles de peau plus complexes (explants de peau ou épidermes humains reconstruits par exemple), apparaît nécessaire pour analyser les interactions entre ces bactéries, mais également entre les bactéries et la peau.

## IV. Relation structure/fonction des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes

Les oligo- et polysaccharides sont des composants omniprésents dans les organismes vivants. Ils sont présents sous forme de chaînes latérales sur les glycoprotéines ou sous forme de polysaccharides liés à des protéines comme dans les protéoglycanes (Faury *et al.*, 2008). Ils participent à de nombreuses fonctions biologiques comme l'organogénèse, la croissance et l'adhésion cellulaire, la signalisation, l'inflammation et les interactions avec les agents pathogènes (Handel *et al.*, 2005 ; Scharnweber *et al.*, 2015). Les ulvanes qui sont également liés de manière covalente à des protéines de la paroi cellulaire d'*Ulva* sp., ont donc des similitudes structurelles avec ces polysaccharides sulfatés (GAG libres et protéoglycanes). Ainsi, nous pouvons supposer que les activités biologiques présentées par les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes se feraient par mimétisme à ces macromolécules biologiques.

Aussi, les caractéristiques structurelles des ulvanes comme le poids moléculaire, le degré de sulfatation et la position des groupements sulfates, la composition monosaccharidique, les liaisons glycosidiques et le degré de ramification influencent leurs bioactivités (Qi *et al.*, 2005a, b ; Adrien *et al.*, 2017b, 2019 ; Tabarsa *et al.*, 2018 ; Kidgell *et al.*, 2020).

L'un des principaux objectifs de recherche de notre travail, mis en avant par l'emploi des deux procédés de dépolymérisation, était d'étudier l'éventuelle relation structure/fonction des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur différentes activités biologiques dans le cadre de potentielles applications en dermo-cosmétique. Cette partie de notre travail avait donc pour objectif principal de répondre à la question suivante :

- Les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes présentent-elles des activités biologiques différentes en fonction de leur composition biochimique/monosaccharidique, de leur degré de sulfatation, et de leurs poids moléculaires ?

Nous avons donc essayé de répondre à cette question en nous intéressant à diverses activités biologiques comme l'inhibition de la LOX (enzyme impliquée dans l'inflammation), la modulation de la prolifération cellulaire et de la synthèse matricielle de fibroblastes dermiques humains, et la modulation de la virulence bactérienne de souches commensales cutanées.

Dans un premier temps, nos travaux mettent en évidence l'importance des groupements sulfates des ulvanes pour l'exercice d'activités biologiques. En effet, la perte d'activité de la fraction d'oligo-ulvanes au niveau de l'inhibition de la LOX, observée dans notre étude, serait en lien avec la perte presque totale des groupements sulfates, survenant lors de la dépolymérisation par hydrolyse acide. En effet, Mogul & Holman (2001) ont montré que le sulfate d'oléyle était un inhibiteur 30 fois plus puissant que l'acide oléique en raison de la force ionique accrue du fragment sulfate. Aussi, Maneesh & Chakraborty (2018) font également l'hypothèse que le groupement sulfate est considéré comme le principal groupement anionique du galactofucane de *Sargassum wightii* et faciliterait sa coordination avec le site actif de la LOX par appariement d'ions empêchant ainsi l'activité de l'enzyme.

Par ailleurs, nous avons également montré que les fractions d'oligo-ulvanes, notamment celles dépolymérisées par hydrolyse acide, n'ont aucun effet sur la synthèse de GAG sulfatés et non sulfatés, à l'inverse des fractions d'ulvanes sulfatées qui stimulent leur production. Dans l'étude d'Adrien *et al.*, (2017b), la dépolymérisation des ulvanes par la même technique entraîne une baisse de la production d'acide hyaluronique en comparaison avec les ulvanes bruts sans pour autant supprimer cette activité. Par comparaison avec leurs travaux, nous supposons que la perte d'activité des ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide serait liée à la perte quasi-totale des groupements sulfates. En effet, les ulvanes dépolymérisés des travaux d'Adrien *et al.* (2017b) ont conservé 70% des sulfates des ulvanes bruts d'origine tandis que ceux de notre étude ont perdu la grande majorité des groupements sulfates associés. Une étude récente d'Adrien *et al.* (2019) a démontré ainsi l'importance du degré de sulfatation sur l'activité biologique des ulvanes puisqu'une fraction d'ulvanes chimiquement sulfatés (contenu en sulfate multiplié par 2 par rapport au polysaccharide d'origine) améliore fortement l'activité anticoagulante. Nos résultats vont donc dans le sens de ces données de littérature démontrant l'importance des groupements sulfates des ulvanes dans l'exercice d'activités biologiques.

Ensuite, nous avons montré que les ulvanes dialysés, en comparaison avec les autres fractions, augmentent davantage la prolifération des fibroblastes et la modulation de la MEC, en s'intéressant à la synthèse de GAG, de collagène total dont collagènes de type I et III. Nous supposons que cette meilleure bioactivité est liée à son contenu plus riche en ulvanes et en groupements sulfates associés en comparaison avec les autres fractions. La teneur plus élevée en ulvanes et donc *a fortiori* en rhamnose de ces fractions permettrait ainsi d'être davantage reconnues par les fibroblastes dermiques humains au niveau d'une lectine membranaire, qui reste à identifier, et donc d'induire davantage la transduction du signal (Faury *et al.*, 2008, 2011).

D'autre part, nos travaux montrent l'influence du poids moléculaire des ulvanes sur l'activité biologique. En effet, dans la seconde partie de notre étude, les fractions d'ulvanes caractérisées par des hauts poids moléculaires (PM > 670 kDa) augmentent davantage la prolifération des fibroblastes en culture que les fractions d'oligo-ulvanes de plus bas poids moléculaires. De même, les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire (PM de 4 – 7 kDa) présentent une meilleure activité sur la prolifération des fibroblastes que les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide de plus faible PM (1,5 kDa). Des résultats similaires ont été obtenus par Andrès *et al.* (2006) puisque la dépolymérisation par hydrolyse acide entraîne une perte d'activité sur la prolifération des fibroblastes (de +60% pour le polysaccharide de 50 kDa à +40% pour celui de 5 kDa). Aussi, nous avons également montré que les fractions d'ulvanes augmentent la synthèse de GAG, de collagène total dont les collagènes de type I et III, et de la MMP-1 par les fibroblastes. Tandis que les fractions d'oligo-ulvanes (ulvanes dépolymérisés : PM < 10 kDa), et en particulier celles de plus faible PM (1,5 kDa) et désulfatées ont des capacités de stimulation inférieures. Par ailleurs, les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire stimulent significativement la synthèse de collagène alors que les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide, de plus bas PM et désulfatés, n'ont aucun effet.

De la même manière, en s'intéressant au potentiel inflammatoire de *C. acnes* RT4 et RT6 sur les kératinocytes HaCaT, nous avons montré que la dépolymérisation et donc la baisse de poids moléculaire entraînait une baisse du potentiel anti-inflammatoire des ulvanes. Kidgell *et al.* (2020) ont récemment montré que les ulvanes de plus hauts poids moléculaires présentent une meilleure activité biologique (réponse immunomodulatoire *via* l'augmentation d'IL-10, -1 $\beta$  et -6, et la baisse de prostaglandine E<sub>2</sub>) en comparaison avec les ulvanes de même composition et de plus bas poids moléculaires. Nos résultats sont donc en accord avec ces données de littérature.

Toutefois, en nous intéressant à l'effet des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la capacité de formation de biofilm de *C. acnes*, nous avons montré que seule la fraction d'oligo-ulvanes de plus bas PM et désulfatée (ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide) présente une activité antibiofilm. De plus, nous avons montré que les ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire augmentent la formation de biofilm de *S. epidermidis* MFP04. Ainsi, divers paramètres (PM et degré de sulfatation) semblent influencer l'activité biologique anti ou pro-biofilm des fractions d'oligo-ulvanes sur les souches testées. La formation du biofilm varie avec la nature des fractions utilisées et dépend de la souche bactérienne.

Dans ces travaux, nous avons essentiellement mis en avant le fait que les activités biologiques des fractions étaient dues à leur composition en ulvanes. Toutefois, les analyses de composition biochimique ont révélé l'existence de protéines dans les fractions, liées de manière forte à ces ulvanes. En effet, nous avons montré que malgré les différents procédés de purification employés, la teneur en protéines de nos fractions restait relativement inchangée. La présence des protéines peut en effet être expliquée par leur existence au niveau de la paroi cellulaire (Robic *et al.*, 2009c) et par la présence de glycoprotéines au niveau d'algues du genre *Ulva* (Abdel-fattah & Sary, 1987 ; Wijesekara *et al.*, 2017). Ainsi, nous ne pouvons pas négliger leurs effets potentiels sur les activités biologiques.

En effet, Bodin *et al.* (2020) ont récemment montré qu'une fraction protéique (PROT-1 : 51% protéines et 22% de polysaccharides) extraite d'*Ulva intestinalis*, composée d'un ensemble majeur de protéines de 25 kDa et d'un autre ensemble de protéines de plus haut PM (> 400 kDa), augmente de manière dose-dépendante la production de collagène et d'acide hyaluronique par les fibroblastes. Par ailleurs, leur étude a également montré que l'hydrolyse enzymatique (protéase Flavourzyme®) de cette fraction protéique (H-PROT-1 composée de 88 peptides de 6 à 15 acides aminés) aboutissait à la perte d'activité biologique, c'est-à-dire procollagène et pro-acide hyaluronique. Les auteurs supposent que la structure native des protéines est responsable de l'activité procollagène exercée par la fraction protéique (Bodin *et al.*, 2020).

En outre, dans notre étude, nous avons mis en avant que la dépolymérisation par les deux procédés employés aboutit à des fractions moins actives du fait de la réduction du poids moléculaire des ulvanes et de leur désulfatation. Désormais, nous pouvons donc rapprocher ce résultat aux travaux de Bodin *et al.* (2020) en supposant également une hydrolyse des protéines lors de la dépolymérisation des fractions en conditions acides (Tsugita & Scheffler, 1982) ou radicalaires (Wolff & Dean, 1986).

Aussi, Bodin *et al.* (2020) ont une fraction protéique également enrichie en polysaccharides (22%) dont la potentielle activité n'est pas à négliger comme le montre nos travaux.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence que les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes présentent des activités biologiques différentes pouvant être attribuées à leurs caractéristiques structurales. Nous avons montré que la présence de groupements sulfates au niveau des ulvanes était un paramètre structural déterminant pour les activités biologiques. Ce travail de thèse permet également de supposer une synergie des activités biologiques des ulvanes et des protéines, dont la dépolymérisation aboutit majoritairement à la diminution de l'activité biologique.

Aussi, ces travaux présentent les fractions d'ulvanes, caractérisées par une majorité de hauts poids moléculaires, comme particulièrement bioactives ce qui est d'un grand intérêt pour de prochaines études et des applications potentielles en dermo-cosmétique puisque le traitement minimal de la matière première permet de réduire les coûts et temps de production. Toutefois, il serait primordial d'étudier le passage transcutané de ces fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes dans un modèle de peau 3D ou sur un explant cutané afin de confirmer les résultats obtenus sur une monoculture cellulaire.

# **Conclusions et perspectives**





## Conclusions et perspectives

Les travaux de thèse, menés au sein du LBCM (Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines) de l'Université Bretagne Sud à Vannes et en collaboration avec l'Université Catholique de l'Ouest de Bretagne Nord à Guingamp, s'inscrivent dans un projet de valorisation de molécules d'une macroalgue proliférative : *Ulva* sp., largement connue pour ses échouages massifs sur le littoral breton. Les objectifs étaient de produire des fractions enrichies en ulvanes, de différents poids moléculaires, par utilisation d'un procédé d'extraction innovant et écoresponsable : l'EAE, et d'évaluer les activités biologiques potentielles de ces fractions sur des fibroblastes dermiques humains et sur des bactéries du microbiote cutané. L'ensemble de nos travaux a permis de (1) développer les connaissances sur la composition biochimique et monosaccharidique des fractions d'ulvanes extraits par EAE en comparaison avec la macération ; (2) comparer des procédés de purification et de dépolymérisation des ulvanes ; (3) identifier des activités biologiques des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues d'*Ulva* sp. sur le système cutané dermique *via* l'étude de la viabilité et la prolifération des fibroblastes et l'expression de composants de la matrice extracellulaire dermique, mais également sur le microbiote cutané *via* la modulation de la virulence de certaines bactéries ; et (4) établir une relation structure/fonction des ulvanes en termes de bioactivités.

Nos travaux concernant la partie extraction ont mis en évidence que le procédé d'EAE permettait de produire davantage d'extraits bruts, particulièrement enrichis en ulvanes. Il pourrait être intéressant d'utiliser un couplage avec une autre technique d'extraction respectueuse de l'environnement comme l'extraction assistée par microondes ou par ultrasons afin d'augmenter les rendements de production. De plus, la production de ces extraits entraîne la production d'un résidu solide qui pourrait être davantage valorisé dans un concept de bioraffinerie avec l'extraction des composants résiduels tels que les protéines, la cellulose et les lipides (Terme *et al.*, 2020).

Les résultats obtenus avec les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sont intéressants puisqu'ils mettent en évidence une augmentation de la prolifération des fibroblastes dermiques humains sans être cytotoxiques pour ces cellules. Tout d'abord, il paraît indispensable *via* l'utilisation de la technologie GLYcoDiag® d'identifier la lectine impliquée dans la liaison du rhamnose des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes aboutissant à la prolifération cellulaire. Nos résultats montrent également une augmentation de la synthèse des collagènes de type I et III au niveau protéique, et de l'expression de collagène de type III au niveau transcriptionnel par les fibroblastes en culture en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes.

Dans un premier temps, il serait intéressant de confirmer au niveau protéique *via* un test ELISA, l'augmentation de collagène de type III afin de compléter les résultats obtenus par Western Blot. En effet, ce collagène est majoritairement présent au niveau du derme et est fortement impliqué dans la régénération tissulaire.

Dans un deuxième temps, il serait recommandé de s'intéresser à l'expression du collagène de type I au niveau transcriptionnel, *via* un suivi cinétique du niveau moyen d'expression des ARNm du gène *COL1A1* des fibroblastes en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. Ceci pourrait permettre de confirmer une stimulation de l'activité transcriptionnelle du collagène de type I de manière précoce, et ainsi mettre en lumière la réponse temps-dépendante et confirmer la régulation négative de la transcription de *COL1A1* après 48 h d'incubation, faisant suite à l'augmentation de la synthèse protéique de collagène.

De plus, afin de confirmer ou infirmer l'implication de la voie du TGF- $\beta$ 1, une étude plus approfondie est à mener. Pour cela, il est nécessaire de s'intéresser à l'expression du niveau moyen d'expression des ARNm et de la synthèse protéique des récepteurs du TGF- $\beta$ 1 (T $\beta$ RI et T $\beta$ RII), autres acteurs de la voie de signalisation. Aussi, un dosage protéique par ELISA et Western Blot serait à envisager afin d'observer une éventuelle modulation de la synthèse de TGF- $\beta$ 1 par les fibroblastes en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. Ceci serait particulièrement intéressant afin de vérifier si l'observation entre la modulation de la synthèse de collagène de type I au niveau protéique et au niveau transcriptionnel est également vraie pour le TGF- $\beta$ 1 après le même temps d'incubation de 48 h. Il serait également pertinent de s'intéresser, par une expérience de retardement sur gel, à évaluer les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur l'activité de liaison des SMAD et de facteurs de transcription comme hc-Krox, Sp1 ou Sp3, activateurs de l'expression de collagène de type I des fibroblastes dermiques (Kypriotou *et al.*, 2007), et NR4A1, impliqué dans le contrôle de la voie de signalisation de TGF- $\beta$  (Palumbo-Zerr *et al.*, 2015). En effet, ces facteurs de transcription se fixent en amont de la partie promotrice de *COL1A1* et permettent finalement la régulation de la synthèse de collagène de type I. Ces études seraient donc particulièrement intéressantes notamment dans le cadre de stratégie de lutte contre le vieillissement dermique ou la fibrose dermique.

Par ailleurs, les résultats ont montré une augmentation de la synthèse au niveau protéique de la MMP-1, mais également une augmentation de son activité enzymatique, corrélée à une augmentation de l'expression au niveau transcriptionnel de *MMP-1* en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. Ce résultat est particulièrement intéressant dans le cadre du remodelage matriciel. Il serait intéressant d'évaluer par zymographie inversée, l'activité du TIMP-1, l'inhibiteur respectif de la MMP-1 afin d'élucider davantage son rôle indirect dans la synthèse protéique du collagène de type I. De plus, bien que l'évaluation de l'élastase avec l'enzyme de pancréas de porc utilisée n'ait démontrée aucune activité d'inhibition des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes, il serait pertinent d'étudier au niveau cellulaire l'activité enzymatique de l'élastase de fibroblastes ainsi que la synthèse d'élastine dans le cadre du renouvellement matriciel.

D'un point de vue mécanistique, nous n'avons pas mis en évidence de modulation significative au niveau transcriptionnel de l'expression de la sous-unité *p65* du NF- $\kappa$ B. De la même façon que dans le cas de *COL1A1*, un suivi cinétique de l'expression des ARNm de *p65* serait à réaliser. Néanmoins, l'analyse du niveau d'expression des ARNm de cette sous-unité de NF- $\kappa$ B est insuffisante pour déterminer l'évolution de l'activité de liaison de ce facteur de transcription sur l'ADN.

Ainsi, l'analyse de l'activité de liaison de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B mais également de sa sous-unité p50, et du facteur de transcription AP-1 pourrait être réalisée par des expériences de retardement sur gel. Il est aussi envisagé de s'intéresser à la voie des MAPK et à l'expression de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1, connues pour augmenter la synthèse de MMP.

Ainsi, les résultats de nos travaux pour les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sont intéressants dans le cadre d'une valorisation en dermo-cosmétique. En effet, l'augmentation de la synthèse de collagène de type I et II, et de GAG a un fort potentiel dans le cadre d'une stratégie anti-vieillesse puisque le vieillissement dermique se caractérise par une baisse de la synthèse de composants matriciels dont les collagènes particulièrement. L'activité augmentée de la MMP-1 permettrait également de prévenir l'apparition d'un phénomène de fibrose. Les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes présenteraient donc l'avantage de participer à un renouvellement matriciel contrôlé et bénéfique. Les résultats sont aussi prometteurs dans le cadre d'une stratégie de réparation cutanée ou de cicatrisation du fait de la synthèse de collagène de type I et III et de l'activité de la MMP-1.

Néanmoins, même si nos résultats *in vitro* sont encourageants, des manipulations *in vitro* sur peaux reconstituées ou bien *ex vivo*, c'est-à-dire sur un tissu entier issu d'une biopsie comme des explants de peau présentant une MEC complexe, sont nécessaires. Ces expérimentations permettraient *in fine* d'évaluer les effets des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sur la synthèse des composants matriciels en considérant un système cutané plus complexe, s'approchant des conditions *in vivo*.

Le système cutané est indéniablement associé à un microbiote cutané qui participe lui aussi à l'homéostasie cutanée. Les résultats obtenus avec les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes ont mis en évidence l'absence d'effet sur le développement de bactéries commensales cutanées comme *S. epidermidis* MFP04, *S. aureus* MFP04 et *C. acnes* RT4 et RT6. Toutefois, la formation de biofilm de *S. epidermidis* et *C. acnes* a été impactée en présence des fractions d'oligo-ulvanes. Ceci se caractérise par une augmentation du biofilm de *S. epidermidis* lorsque la bactérie est cultivée avec la fraction d'ulvanes dépolymérisés par hydrolyse radicalaire et une diminution du biofilm de *C. acnes* lorsqu'elle est cultivée avec la fraction d'ulvanes dépolymérisés par hydrolyse acide. La modulation de formation de biofilm de ces souches en présence des fractions d'oligo-ulvanes pourrait présenter un avantage en cas de dysbiose cutanée. Une expérience de co-culture des souches RT4 et RT6 pourrait être réalisée afin d'étudier si l'une des souches de *C. acnes* est favorisée en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. Aussi, concernant l'étude de la formation de biofilm par observation au microscope confocal à balayage laser, celle-ci pourrait être complétée par une expérience où l'étape d'adhésion des cultures de *C. acnes* en présence des fractions d'oligo-ulvanes est étudiée. Une autre étude de la formation de biofilm pourrait également être menée par la technique de coloration au cristal violet faisant intervenir un autre type de support (polystyrène) et donc potentiellement mettre en lumière des résultats supplémentaires en accord avec les différentes polarités de surface bactérienne.

Les bactéries *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes* se trouvent en contact au niveau de la peau. Ainsi, l'étude de leur formation de biofilms mixtes des souches bactériennes (*S. epidermidis*/*S. aureus*, *S. aureus*/*C. acnes* RT4 ou RT6, *C. acnes* RT4/RT6) pourraient être intéressantes afin d'étudier leurs potentiels interactions par l'utilisation d'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes. Par ailleurs, l'étude de l'expression de facteurs de virulence de la souche acnéique RT4 comme la triglycéride lipase ou les porphyrines, connus pour leur capacité à induire l'inflammation (Holland *et al.*, 2010 ; Johnson *et al.*, 2016), en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes serait à réaliser.

Nos résultats ont également permis de montrer que les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes présentent un potentiel anti-inflammatoire *via* le test d'inhibition de la lipoxygénase mais également *via* la réduction d'IL-8 sécrétée par les kératinocytes suite à l'infection par les souches acnéique et non acnéique de *C. acnes*. Cette bioactivité des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes est, donc particulièrement, prometteuse pour la restauration de l'homéostasie cutanée suite à des processus inflammatoires dans le cadre de pathologies cutanées comme l'acné. Afin de compléter l'étude sur la réponse inflammatoire des cellules induite par *C. acnes*, les dosages par test ELISA d'une autre cytokine inflammatoire, l'IL-1 $\alpha$ , serait à réaliser. Aussi, l'étude aux niveaux transcriptomique et protéomique des TLR2, impliqués dans l'initiation des réponses inflammatoires des kératinocytes pourrait être réalisée. Ces études pourraient être réalisées en cultivant les souches de *C. acnes* en présence des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes mais également en incubant les cellules avec les fractions et de les infecter par la suite afin de voir les effets au niveau cellulaire sur la voie des MAPK.

Ainsi, les résultats de nos travaux pour les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sont intéressants dans le cadre d'une valorisation en dermo-cosmétique puisque le microbiote cutané ciblé n'est pas altéré en leur présence. Les fractions pourraient donc être valorisées dans une stratégie de réparation cutanée avec pour cibles une limitation de l'inflammation excessive (inhibition de la LOX et diminution de l'inflammation induite par les ribotypes de *C. acnes*) et un renouvellement matriciel de la MEC (synthèse concomitante de collagènes et MMP). Les résultats sont par ailleurs prometteurs dans le cadre d'une stratégie anti-inflammatoire. Le potentiel anti-inflammatoire des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes pourrait également être étudié dans des modèles biologiques plus complexes comme des modèles *in vitro* de peaux reconstruites ou *ex vivo* d'explants de peau.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence une relation structure/fonction des ulvanes liée à l'abondance des ulvanes mais également à leur structure et leur composition chimique spécifique en groupements sulfates. Ainsi, d'un point de vue composition et structure, il serait pertinent de finaliser la caractérisation des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes notamment les séquences osidiques et les enchaînements oligosaccharidiques par RMN et UHPLC-MS/MS. Afin de compléter notre étude et améliorer la compréhension de la relation structure/fonction, il serait intéressant de déterminer de façon précise, par les mêmes méthodes analytiques, les niveaux de sulfatation atteints à l'échelle de l'unité disaccharidique ainsi que la position des sulfates dans les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes.

Aussi, malgré l'activité *in vitro* des fractions d'ulvanes de hauts poids moléculaires, nous supposons que dans un modèle plus complexe, ces hauts PM n'auraient pas accès aux lectines des cellules et donc que l'activité des plus bas poids moléculaires sulfatés serait à privilégier.

Afin d'étudier davantage cette hypothèse, il pourrait être intéressant dans les fractions d'ulvanes arborant une polydispersité de hauts et bas poids moléculaires sulfatés de procéder à (1) un fractionnement par l'utilisation de centricon afin d'évaluer uniquement l'activité des bas poids moléculaires sulfatés ; ou (2) à une dépolymérisation moins longue des fractions suivie d'un fractionnement sur centricon (Kidgell *et al.*, 2020) ; ou (3) à la production d'oligosaccharides riches en groupements sulfates *via* un procédé de dépolymérisation sur résine échangeuse d'ions suivi d'une méthode de sulfatation chimique (Adrien *et al.*, 2019). Par ailleurs, la non-sélectivité de la méthode de sulfatation chimique pourrait mettre en avant l'importance de la position des groupements sulfates dans l'activité biologique des ulvanes.

De plus, nous avons montré que la dépolymérisation pouvait être contrôlée en termes de poids moléculaires obtenus et que le poids moléculaire avait un rôle dans l'exercice de la bioactivité. Il est donc envisagé de produire des fractions à façon et de réaliser des mélanges de différents poids moléculaires afin d'évaluer ensuite les différences de bioactivités entre ces fractions.

Une autre perspective dans l'étude de la relation structure/fonction est de procéder après dépolymérisation à un réagencement de l'enchaînement monosaccharidique afin d'évaluer, au niveau cellulaire, si la bioactivité est dépendante d'une séquence régulière ou d'un motif de séquence spécifique. Pour cela, l'utilisation d'enzymes comme les glucosyltransférases (glucansucrases) est envisagée (Champion *et al.*, 2009). Ceci pourrait être couplé à l'évaluation des bioactivités de standard d'ulvanes raffinés de poids moléculaire connu, sulfaté et non sulfaté, dépourvus de protéines, afin de confirmer ou infirmer les différents résultats de l'étude. En effet, ces derniers ont montré que les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes sont également composées de protéines, susceptibles d'être hydrolysées en peptides *via* les différents procédés de dépolymérisation employés. Aussi, il serait pertinent de réaliser un SDS-PAGE afin de confirmer l'hydrolyse des protéines en peptides et ainsi rapprocher cela des résultats de Bodin *et al.* (2020). Afin de déterminer, s'il existe effectivement une synergie entre ulvanes et protéines sur les activités biologiques, il apparaît nécessaire de mettre en place un protocole efficace de séparation des protéines/polysaccharides des fractions par l'utilisation d'une chromatographie d'échanges d'anions couplée à un détecteur UV à la longueur d'onde de 280 nm pour la détection des protéines (Kidgell *et al.*, 2020), et évaluer ensuite les activités biologiques respectives. Si la fraction totale, non purifiée, est alors présentatrice des différentes activités biologiques présentées précédemment, alors ceci sera particulièrement intéressant dans le cadre d'une valorisation industrielle puisqu'il n'y aura aucune nécessité de mise en place de procédé de purification.

En conclusion, les résultats obtenus *in vitro*, permettent d'envisager de potentielles applications dans le domaine à haute valeur ajoutée de la dermo-cosmétique des fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes issues de l'algue proliférative *Ulva* sp., faiblement valorisée à l'heure actuelle. Cette valorisation pourrait notamment se faire dans le cadre de stratégies de réparation tissulaire et/ou anti-vieillessement mais également anti-inflammatoire, tout en respectant la flore commensale cutanée. Dans cette perspective, il apparaît désormais important d'instaurer des études *ex vivo* et *a fortiori in vivo*.

# **Bibliographie**





# Bibliographie

- Abba, M., Patil, N., Leupold, J. & Allgayer, H. (2016). MicroRNA Regulation of Epithelial to Mesenchymal Transition. *Journal of Clinical Medicine*, 5, 8.
- Abd El All, H.S., Shoukry, N.S., El Maged, R.A. & Ayada, M.M. (2007). Immunohistochemical expression of interleukin 8 in skin biopsies from patients with inflammatory acne vulgaris. *Diagnostic Pathology*, 2, 4.
- Abdallah, F., Mijouin, L. & Pichon, C. (2017). Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1–17.
- Abdel-fattah, A.F. & Sary, H.H. (1987). Glycoproteins from *Ulva lactuca*. *Phytochemistry*, 26, 1447–1448.
- Achermann, Y., Goldstein, E.J.C., Coenye, T. & Shirliffa, M.E. (2014). *Propionibacterium acnes*: from Commensal to Opportunistic Biofilm-Associated Implant Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 27, 419–440.
- 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., *et al.* (2012). The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59, 429–514.
- Adrien, A. (2016). Production pilote de polysaccharides sulfatés issus de macroalgues marines à visées anti-coagulante et cosmétique anti-âge. Thèse de l'Université de la Rochelle - Spécialité valorisation chimique et biologique des agroressources. Soutenue le 28 juin 2016 à La Rochelle.
- Adrien, A., Dufour, D., Baudouin, S., Maugard, T. & Bridiau, N. (2017a). Evaluation of the anticoagulant potential of polysaccharide-rich fractions extracted from macroalgae. *Natural Product Research*, 31, 2126–2136.
- Adrien, A., Bonnet, A., Dufour, D., Baudouin, S., Maugard, T. & Bridiau, N. (2017b). Pilot production of ulvans from *Ulva* sp. and their effects on hyaluronan and collagen production in cultured dermal fibroblasts. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1306–1314.
- Adrien, A., Bonnet, A., Dufour, D., Baudouin, S., Maugard, T., Bridiau, N., Adrien, A., Bonnet, A., Dufour, D., Baudouin, S., Maugard, T. & Bridiau, N. (2019). Anticoagulant activity of sulfated ulvan isolated from the green macroalga *Ulva rigida*. *Marine Drugs*, 17, 291.
- Aguilar-Briseño, J., Cruz-Suarez, L., Sassi, J.-F., Ricque-Marie, D., Zapata-Benavides, P., Mendoza-Gamboa, E., Rodríguez-Padilla, C. & Trejo-Avila, L. (2015). Sulphated Polysaccharides from *Ulva clathrata* and *Cladosiphon okamuranus* Seaweeds both Inhibit Viral Attachment/Entry and Cell-Cell Fusion, in NDV Infection. *Marine Drugs*, 13, 697–712.
- Ahn, C.-B., Jeon, Y.-J., Kang, D.-S., Shin, T.-S. & Jung, B.-M. (2004). Free radical scavenging activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Scytosiphon lomentaria* by electron spin resonance spectrometry. *Food Research International*, 37, 253–258.
- Akaza, N., Akamatsu, H., Kishi, M., Mizutani, H., Ishii, I., Nakata, S. & Matsunaga, K. (2009). Effects of *Propionibacterium acnes* on various mRNA expression levels in normal human epidermal keratinocytes *in vitro*. *Journal of Dermatology*, 36, 213–223.
- Al-Amoudi, O.A., Mutawie, H.H., Patel, A. V. & Blunden, G. (2009). Chemical composition and antioxidant activities of Jeddah cornice algae, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 16, 23–29.

- Alba, K. & Kontogiorgos, V. (2019). Seaweed Polysaccharides (Agar, Alginate, Carrageenan). Melton, L., Shahidi, F. & Varelis, P. (eds). *Encyclopedia of Food Chemistry*. Academic Press, 240–250.
- Alcimed. (2016). Skin microbiome - The development of a science that will transform the cosmetic industry. Paris.
- Allen, H.B. & Mueller, J.L. (2011). A novel finding in atopic dermatitis: film-producing *Staphylococcus epidermidis* as an etiology. *International Journal of Dermatology*, 50, 992–993.
- Allen, H.B., Vaze, N.D., Choi, C., Hailu, T., Tulbert, B.H., Cusack, C.A. & Joshi, S.G. (2014). The presence and impact of biofilm-producing staphylococci in atopic dermatitis. *JAMA Dermatology*, 150, 260–265.
- Alves, A., Caridade, S.G., Mano, J.F., Sousa, R.A. & Reis, R.L. (2010). Extraction and physico-chemical characterization of a versatile biodegradable polysaccharide obtained from green algae. *Carbohydrate Research*, 345, 2194–2200.
- Alves, A., Sousa, R.A. & Reis, R.L. (2013a). Processing of degradable ulvan 3D porous structures for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A, 998–1006.
- Alves, A., Sousa, R.A. & Reis, R.L. (2013b). A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *Journal of Applied Phycology*, 25, 407–424.
- Alves, A., Sousa, R.A. & Reis, R.L. (2013c). *In vitro* cytotoxicity assessment of ulvan, a polysaccharide extracted from green algae. *Phytotherapy Research*, 27, 1143–1148.
- Andrès, E., Molinari, J., Péterszegi, G., Mariko, B., Ruszova, E., Velebny, V., Faury, G. & Robert, L. (2006). Pharmacological properties of rhamnose-rich polysaccharides, potential interest in age-dependent alterations of connective tissues. *Pathologie Biologie*, 54, 420–425.
- Annes, J.P., Munger, J.S. & Rifkin, D.B. (2003). Making sense of latent TGF $\beta$  activation. *Journal of Cell Science*, 116, 217–224.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183–198.
- Apte, S.S. & Parks, W.C. (2015). Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biology*, 44–46, 1–6.
- Arpino, V., Brock, M. & Gill, S.E. (2015). The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biology*, 44–46, 247–254.
- Arrecubieta, C., Lee, M.-H., Macey, A., Foster, T.J. & Lowy, F.D. (2007). SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* Surface Protein, Binds Type I Collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 18767–18776.
- Artlett, C.M., Chen, S.J., Varga, J. & Jimenez, S.A. (1998). Modulation of basal expression of the human  $\alpha 1(I)$  procollagen gene (*COL1A1*) by tandem NF-1/Sp1 promoter elements in normal human dermal fibroblasts. *Matrix Biology*, 17, 425–434.
- Aryee, A. & Edgeworth, J.D. (2017). Carriage, clinical microbiology and transmission of *Staphylococcus aureus*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 409, 1–19.
- Assaw, S., Rosli, N.L., Azmi, N.A.M., Mazlan, N.W. & Ismail, N. (2018). Antioxidant and antibacterial activities of polysaccharides and methanolic crude extracts of local edible red seaweed *Gracilaria* sp. *Malaysian Applied Biology*, 47, 135–144.

- Association Médicale Mondiale. (2013). Déclaration d'Helsinki de l'AMM – Principes éthiques applicables à la recherche médicale impliquant des êtres humains. Fortaleza.
- Aubin, G.G., Portillo, M.E., Trampuz, A. & Corvec, S. (2014). *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: From acne to implant-infections, from phylotype to resistance. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 44, 241–250.
- Ayoub, A., Pereira, J.M., Rioux, L.E., Turgeon, S.L., Beaulieu, M. & Moulin, V.J. (2015). Role of seaweed laminaran from *Saccharina longicruris* on matrix deposition during dermal tissue-engineered production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 13–20.
- Bainbridge, P. (2013). Wound healing and the role of fibroblasts. *Journal of Wound Care*, 22, 407–412.
- Baker, A.H., Edwards, D.R. & Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: Biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science*, 115, 3719–3727.
- Balar, N.B. & Mantri, V.A. (2020). Insights into life cycle patterns, spore formation, induction of reproduction, biochemical and molecular aspects of sporulation in green algal genus *Ulva*: implications for commercial cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 32, 473–484.
- Baldauf, S.L. (2008). An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *Journal of Systematics and Evolution*, 46, 263–273.
- Baldwin, H.E., Bhatia, N.D., Friedman, A., Eng, R.M. & Seite, S. (2017). The role of cutaneous microbiota harmony in maintaining a functional skin barrier. *Journal of Drugs in Dermatology*, 16, 12–18.
- Ballu, S. (2015). Typologie des échouages de macro-algues opportunistes, modalités d'évaluation, état des lieux et évolution de la qualité des masses d'eau côtières et de transition du Morbihan. *Rencontre départementale de l'environnement Prolifération et échouage d'algues sur les côtes: origines, processus et impacts*. Vannes.
- Barbieri, J.S., Wanat, K. & Seykora, J. (2014). Skin: Basic Structure and Function. *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*. Elsevier Inc., 1134–1144.
- Barchowsky, A., Frleta, D. & Vincenti, M.P. (2000). Integration of the NF- $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: Divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. *Cytokine*, 12, 1469–1479.
- Barros, A.A.A., Alves, A., Nunes, C., Coimbra, M.A., Pires, R.A. & Reis, R.L. (2013). Carboxymethylation of ulvan and chitosan and their use as polymeric components of bone cements. *Acta Biomaterialia*, 9, 9086–9097.
- Bashiardes, S., Zilberman-Schapira, G. & Elinav, E. (2016). Use of metatranscriptomics in microbiome research. *Bioinformatics and Biology Insights*, 10, 19–25.
- Bastos, M.C.F., Ceotto, H., Coelho, M.L. V. & Nascimento, J.S. (2009). Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 38–61.
- Baugé, C., Cauvard, O., Leclercq, S., Galéra, P. & Boumédiène, K. (2011). Modulation of transforming growth factor beta signalling pathway genes by transforming growth factor beta in human osteoarthritic chondrocytes: Involvement of Sp1 in both early and late response cells to transforming growth factor beta. *Arthritis Research and Therapy*, 13, R23.

- Beauchef, G., Bigot, N., Kyriotou, M., Renard, E., Porée, B., Widom, R., Domp martin-Blanchere, A., Oddos, T., Maquart, F.X., Demoor, M., Boumediene, K. & Galera, P. (2012). The p65 subunit of NF- $\kappa$ B inhibits *COL1A1* gene transcription in human dermal and scleroderma fibroblasts through its recruitment on promoter by protein interaction with transcriptional activators (c-Krox, Sp1, and Sp3). *Journal of Biological Chemistry*, 287, 3462–3478.
- Belkaid, Y. & Segre, J.A. (2014). Dialogue between skin microbiota and immunity. *Science*, 346, 954–959.
- Benbow, U. & Brinckerhoff, C.E. (1997). The AP-1 site and MMP gene regulation: What is all the fuss about? *Matrix Biology*, 15, 519–526.
- Benyon, R.C. (1989). The human skin mast cell. *Clinical and Experimental Allergy*, 19, 375–387.
- Bernatová, S., Samek, O., Pilát, Z., Šerý, M., Ježek, J., Jákl, P., Šiler, M., Krzyžánek, V., Zemánek, P., Holá, V., Dvořáčková, M. & Růžička, F. (2013). Following the Mechanisms of Bacteriostatic versus Bactericidal Action Using Raman Spectroscopy. *Molecules*, 18, 13188–13199.
- Bernstein, E.F. & Uitto, J. (1996). The effect of photodamage on dermal extracellular matrix. *Clinics in Dermatology*, 14, 143–151.
- Bernstein, E.F., Underhill, C.B., Hahn, P.J., Brown, D.B. & Uitto, J. (1996). Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans. *British Journal of Dermatology*, 135, 255–262.
- Berri, M., Olivier, M., Holbert, S., Dupont, J., Demais, H., Le Goff, M. & Collen, N. (2017). Ulvan from *Ulva armoricana* (Chlorophyta) activates the PI3K/Akt signalling pathway *via* TLR4 to induce intestinal cytokine production. *Algal Research*, 28, 39–47.
- Beylot, C., Auffret, N., Poli, F., Claudel, J.P., Leccia, M.T., Del Giudice, P. & Dréno, B. (2014). *Propionibacterium acnes*: An update on its role in the pathogenesis of acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 28, 271–278.
- Białecka, A., Mak, M., Biedroń, R., Bobek, M., Kaspro wicz, A. & Marcinkiewicz, J. (2005). Different pro-inflammatory and immunogenic potentials of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*: Implications for chronic inflammatory acne. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 53, 79–85.
- Bigot, N., Beauchef, G., Hervieu, M., Oddos, T., Demoor, M., Boumediene, K. & Galéra, P. (2012). NF- $\kappa$ B accumulation associated with *COL1A1* transactivators defects during chronological aging represses type I collagen expression through a 112/61-bp region of the *COL1A1* promoter in human skin fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, 132, 2360–2367.
- Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54, 484–489.
- Bodin, J., Adrien, A., Bodet, P.-E., Dufour, D., Baudouin, S., Maugard, T. & Bridiau, N. (2020). *Ulva intestinalis* Protein Extracts Promote *In Vitro* Collagen and Hyaluronic Acid Production by Human Dermal Fibroblasts. *Molecules*, 25, 2091.
- Bond, M., Baker, A.H. & Newby, A.C. (1999). Nuclear factor  $\kappa$ B activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264, 561–567.
- Bondu, S. (2009). Analyses structurales des carbohydrates de l'algue *Soliera chordalis* (Rhodophyta) et étude de leurs fonctions métaboliques, possibilités d'application dans le domaine de la cancérologie-immunologie. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale. Soutenue en 2009 à Brest.

- Bonifant, H. & Holloway, S. (2019). A review of the effects of ageing on skin integrity and wound healing. *British Journal of Community Nursing*, 24, S28–S33.
- Borrel, V., Gannesen, A.V., Barreau, M., Gaviard, C., Duclairoir-Poc, C., Hardouin, J., Konto-Ghiorgi, Y., Lefeuvre, L. & Feuilloley, M.G.J. (2019a). Adaptation of acneic and non acneic strains of *Cutibacterium acnes* to sebum-like environment. *MicrobiologyOpen*, 8, e00841.
- Borrel, V., Thomas, P., Catovic, C., Racine, P.-J., Konto-Ghiorgi, Y., Lefeuvre, L., Duclairoir-Poc, C., Zouboulis, C.C. & Feuilloley, M.G.J. (2019b). Acne and Stress: Impact of Catecholamines on *Cutibacterium acnes*. *Frontiers in Medicine*, 6, 155.
- Botos, I., Segal, D.M. & Davies, D.R. (2011). The structural biology of Toll-like receptors. *Structure*, 19, 447–459.
- Bou-Gharios, G., Abraham, D. & de Crombrughe, B. (2019). Type I collagen structure, synthesis, and regulation. Bilezikian, J.P., Martin, T.J., Clemens, T.L. & Rosen, C.J. (eds). *Principles of Bone Biology*, Fourth. Elsevier, 295–337.
- Boulou, A. (2001). Les cellules dendritiques cutanées humaines. *Médecine/sciences*, 17, 465–474.
- Bourgougnon, N., Gervois, A. & Jegou, C. (2021). Les algues marines. *Sortie troisième trimestre chez ELLIPSES*.
- Bouslimani, A., Porto, C., Rath, C.M., Wang, M., Guo, Y., Gonzalez, A., Berg-Lyon, D., Ackermann, G., Moeller Christensen, G.J., Nakatsuji, T., et al. (2015). Molecular cartography of the human skin surface in 3D. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, E2120–E2129.
- Bouyoucef, M., Rakic, R., Gómez-Leduc, T., Latire, T., Marin, F., Leclercq, S., Carreiras, F., Serpentine, A., Lebel, J.M., Galéra, P. & Legendre, F. (2018). Regulation of Extracellular Matrix Synthesis by Shell Extracts from the Marine Bivalve *Pecten maximus* in Human Articular Chondrocytes—Application for Cartilage Engineering. *Marine Biotechnology*, 20, 436–450.
- Braccini, I. & Pérez, S. (2001). Molecular basis of Ca<sup>2+</sup>-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2, 1089–1096.
- Brandwein, M., Steinberg, D. & Meshner, S. (2016). Microbial biofilms and the human skin microbiome. *Biofilms and Microbiomes*, 2, 3.
- Brauchle, M., Glück, D., Di Padova, F., Han, J. & Gram, H. (2000). Independent role of p38 and ERK1/2 mitogen-activated kinases in the upregulation of matrix metalloproteinase-1. *Experimental Cell Research*, 258, 135–144.
- Brauweiler, A.M., Bin, L., Kim, B.E., Oyoshi, M.K., Geha, R.S., Goleva, E. & Leung, D.Y.M. (2013). Filaggrin-dependent secretion of sphingomyelinase protects against staphylococcal  $\alpha$ -toxin-induced keratinocyte death. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131, 421–427.
- Brauweiler, A.M., Goleva, E. & Leung, D.Y.M. (2014). Th2 cytokines increase *Staphylococcus aureus* alpha toxin-induced keratinocyte death through the signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6). *Journal of Investigative Dermatology*, 134, 2114–2121.
- Breuer, K., Wittmann, M., Kempe, K., Kapp, A., Mai, U., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Mrabet-Dahbi, S. & Werfel, T. (2005). Alpha-toxin is produced by skin colonizing *Staphylococcus aureus* and induces a T helper type 1 response in atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 35, 1088–1095.
- Briand, X. (1991). Seaweed harvesting in Europe. Guiry, M.D. & Blunden, G. (eds). *Seaweed resources in Europe: uses and potential*. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 259–308.



- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y. & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, 303, 1532–1535.
- Brown, M.W., Sharpe, S.C., Silberman, J.D., Heiss, A.A., Lang, B.F., Simpson, A.G.B. & Roger, A.J. (2013). Phylogenomics demonstrates that breviate flagellates are related to opisthokonts and apusomonads. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280, 20131755.
- Brown, M.M. & Horswill, A.R. (2020). *Staphylococcus epidermidis*—Skin friend or foe? *PLOS Pathogens*, 16, e1009026.
- Brüggemann, H. (2010). Skin: Acne and *Propionibacterium acnes* Genomics. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Berlin, Heidelberg, 3215–3225.
- Brunt, E.G. & Burgess, J.G. (2018). The promise of marine molecules as cosmetic active ingredients. *International Journal of Cosmetic Science*, 40, 1–15.
- Burke, E.M., Horton, W.E., Pearson, J.D., Crow, M.T. & Martin, G.R. (1994). Altered transcriptional regulation of human interstitial collagenase in cultured skin fibroblasts from older donors. *Experimental Gerontology*, 29, 37–53.
- Burkhart, C.G. & Burkhart, C.N. (2007). Expanding the microcomedone theory and acne therapeutics: *Propionibacterium acnes* biofilm produces biological glue that holds corneocytes together to form plug. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57, 722–724.
- Burki, F., Kaplan, M., Tikhonenkov, D. V., Zlatogursky, V., Minh, B.Q., Radaykina, L. V., Smirnov, A., Mylnikov, A.P. & Keeling, P.J. (2016). Untangling the early diversification of eukaryotes: A phylogenomic study of the evolutionary origins of centrohelida, haptophyta and cryptista. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283, 2015–2802.
- Byrd, A.L., Deming, C., Cassidy, S.K.B., Harrison, O.J., Ng, W.I., Conlan, S., Belkaid, Y., Segre, J.A. & Kong, H.H. (2017). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strain diversity underlying pediatric atopic dermatitis. *Science Translational Medicine*, 9, eaal4651.
- Byrd, A.L., Belkaid, Y. & Segre, J.A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 143–155.
- Cabral-Pacheco, G.A., Garza-Veloz, I., Castruita De La Rosa, C., Ramirez-Acuña, J.M., Perez-Romero, B.A., Guerrero-Rodriguez, J.F., Martinez-Avila, N. & Martinez-Fierro, M.L. (2020). The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 9739.
- Cai, C., Guo, Z., Yang, Y., Geng, Z., Tang, L., Zhao, M., Qiu, Y., Chen, Y. & He, P. (2016). Inhibition of hydrogen peroxide induced injuring on human skin fibroblast by *Ulva prolifera* polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 241–247.
- Caley, M.P., Martins, V.L.C. & O'Toole, E.A. (2015). Metalloproteinases and Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 4, 225–234.
- Campisi, J. (1998). The Role of Cellular Senescence in Skin Aging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 3, 1–5.
- Cañedo-Dorantes, L. & Cañedo-Ayala, M. (2019). Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *International Journal of Inflammation*, 3706315.
- Capone, K.A., Dowd, S.E., Stamatias, G.N. & Nikolovski, J. (2011). Diversity of the human skin microbiome early in life. *The Journal of Investigative Dermatology*, 131, 2026–32.

- Casas, M.P. & Domínguez González, H. (2017). Enzyme-Assisted Aqueous Extraction Processes. *Water Extraction of Bioactive Compounds*, 333–368.
- Casas, M.P., Conde, E., Domínguez, H. & Moure, A. (2019). Ecofriendly extraction of bioactive fractions from *Sargassum muticum*. *Process Biochemistry*, 79, 166–173.
- Cerdan, D., Grillon, C., Monsigny, M., Redziniak, G. & Kieda, C. (1991). Human keratinocyte membrane lectins: characterization and modulation of their expression by cytokines. *Biology of the Cell*, 73, 35–42.
- Cernadas, H., Flórez-Fernández, N., González-Muñoz, M.J., Domínguez, H. & Torres, M.D. (2019). Retrieving of high-value biomolecules from edible *Himanthalia elongata* brown seaweed using hydrothermal processing. *Food and Bioprocesses Processing*, 117, 275–286.
- CEVA. (2018). Suivi des blooms de macroalgues opportunistes sur le littoral Loire-Bretagne, Réseau de Contrôle Opérationnel - DCE 2018 Inventaire des marées vertes sur le littoral breton.
- Chakraborty, K. & Antony, T. (2019). First report of spiro-compounds from marine macroalga *Gracilaria salicornia*: prospective natural anti-inflammatory agents attenuate 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2. *Natural Product Research*, 35, 1–12.
- Champion, E., André, I., Mulard, L.A., Monsan, P., Remaud-Siméon, M. & Morel, S. (2009). Synthesis of L-Rhamnose and N-Acetyl-D-Glucosamine Derivatives Entering in the Composition of Bacterial Polysaccharides by Use of Glucansucrases. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 28, 142–160.
- Charlier, R., Morand, P., Finkl, C. & Thys, A. (2007). Green Tides on the Brittany Coasts. *Environmental Research Engineering and Management*, 3, 52–59.
- Chattopadhyay, K., Adhikari, U., Lerouge, P. & Ray, B. (2007). Polysaccharides from *Caulerpa racemosa*: Purification and structural features. *Carbohydrate Polymers*, 68, 407–415.
- Chen, S.J., Artlett, C.M., Jimenez, S.A. & Varga, J. (1998). Modulation of human  $\alpha 1$  (I) procollagen gene activity by interaction with Sp1 and Sp3 transcription factors *in vitro*. *Gene*, 215, 101–110.
- Chen, S.J., Yuan, W., Mori, Y., Levenson, A., Trojanowska, M. & Varga, J. (1999). Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF- $\beta$ : Involvement of Smad 3. *Journal of Investigative Dermatology*, 112, 49–57.
- Chen, D., Smith, L.R., Khandekar, G., Patel, P., Yu, C.K., Zhang, K., Chen, C.S., Han, L. & Wells, R.G. (2020). Distinct effects of different matrix proteoglycans on collagen fibrillogenesis and cell-mediated collagen reorganization. *Scientific Reports*, 10, 19065.
- Cheon, D., Kim, J., Shin, H.-C. & Kim, Y. (2019). Target Proteins of Phloretin for Its Anti-Inflammatory and Antibacterial Activities Against *Propionibacterium acnes*-Induced Skin Infection. *Molecules*, 24, 1319.
- Cheung, P.C.K. (1999). Temperature and pressure effects on supercritical carbon dioxide extraction of n-3 fatty acids from red seaweed. *Food Chemistry*, 65, 399–403.
- Cheung, G.Y.C., Joo, H.S., Chatterjee, S.S. & Otto, M. (2014). Phenol-soluble modulins - critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 38, 698–719.
- Chi, Y., Li, H., Wang, P., Du, C., Ye, H., Zuo, S., Guan, H. & Wang, P. (2020). Structural characterization of ulvan extracted from *Ulva clathrata* assisted by an ulvan lyase. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115497.



- Choi, J.Y., Piao, M.S., Lee, J.B., Oh, J.S., Kim, I.G. & Lee, S.C. (2008). *Propionibacterium acnes* stimulates pro-matrix metalloproteinase-2 expression through tumor necrosis factor- $\alpha$  in human dermal fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, 128, 846–854.
- Christensen, G.J.M. & Brüggemann, H. (2014). Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Beneficial Microbes*, 5, 201–215.
- Christensen, G.J.M., Scholz, C.F.P., Enghild, J., Rohde, H., Kilian, M., Thürmer, A., Brzuszkiewicz, E., Lomholt, H.B. & Brüggemann, H. (2016). Antagonism between *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* and its genomic basis. *BMC Genomics*, 17, 152.
- Ciancia, M., Alberghina, J., Arata, P.X., Benavides, H., Leliaert, F., Verbruggen, H. & Estevez, J.M. (2012). Characterization of Cell Wall Polysaccharides of the Coencocytic Green Seaweed *Bryopsis Plumosa* (Bryopsidaceae, Chlorophyta) from the Argentine Coast. *Journal of Phycology*, 48, 326–335.
- Clarke, S.R., Harris, L.G., Richards, R.G. & Foster, S.J. (2002). Analysis of Ehb, a 1.1-Megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 70, 6680–6687.
- Classen, A., Kalali, B.N., Schnopp, C., Andres, C., Aguilar-Pimentel, J.A., Ring, J., Ollert, M. & Mempel, M. (2011). TNF receptor I on human keratinocytes is a binding partner for staphylococcal protein A resulting in the activation of NF kappa B, AP 1, and downstream gene transcription. *Experimental Dermatology*, 20, 48–52.
- Claudel, J.P., Auffret, N., Leccia, M.T., Poli, F., Corvec, S. & Dréno, B. (2019). *Staphylococcus epidermidis*: A Potential New Player in the Physiopathology of Acne? *Dermatology*, 235, 287–294.
- Clausen, M.L., Agner, T., Lilje, B., Edslev, S.M., Johannesen, T.B. & Andersen, P.S. (2018). Association of disease severity with skin microbiome and filaggrin gene mutations in adult atopic dermatitis. *JAMA Dermatology*, 154, 293–300.
- Čmelík, R., Štikarovská, M. & Chmelík, J. (2004). Different behavior of dextrans in positive-ion and negative-ion mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 1467–1473.
- Coates, M., Blanchard, S. & MacLeod, A.S. (2018). Innate antimicrobial immunity in the skin: A protective barrier against bacteria, viruses, and fungi. *PLoS Pathogens*, 14, e1007353.
- Coenye, T., Peeters, E. & Nelis, H.J. (2007). Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. *Research in Microbiology*, 158, 386–392.
- Cogen, A.L., Nizet, V. & Gallo, R.L. (2008). Skin microbiota: a source of disease or defence? *British Journal of Dermatology*, 158, 442–455.
- Cogen, A.L., Yamasaki, K., Sanchez, K.M., Dorschner, R.A., Lai, Y., MacLeod, D.T., Torpey, J.W., Otto, M., Nizet, V., Kim, J.E. & Gallo, R.L. (2010a). Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130, 192–200.
- Cogen, A.L., Yamasaki, K., Muto, J., Sanchez, K.M., Crotty Alexander, L., Tanios, J., Lai, Y., Kim, J.E., Nizet, V. & Gallo, R.L. (2010b). *Staphylococcus epidermidis* Antimicrobial  $\delta$ -Toxin (Phenol-Soluble Modulin- $\gamma$ ) Cooperates with Host Antimicrobial Peptides to Kill Group A Streptococcus. *PLoS ONE*, 5, e8557.
- Cole, M.A., Quan, T., Voorhees, J.J. & Fisher, G.J. (2018). Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 12, 35–43.

- Collén, P.N., Sassi, J.F., Rogniaux, H., Marfaing, H. & Helbert, W. (2011). Ulvan Lyases Isolated from the Flavobacteria *Persicivirga ulvanivorans* Are the First Members of a New Polysaccharide Lyase Family. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 42063–42071.
- Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M., Carlino, C., Corsetto, P.A., Scaccabarozzi, D., Calvieri, S., Gismondi, A., Taramelli, D. & Dell'Agli, M. (2017). HaCaT Cells as a Reliable *In Vitro* Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators of Inflammation*, 2017, 7435621.
- Cong, T.X., Hao, D., Wen, X., Li, X.H., He, G. & Jiang, X. (2019). From pathogenesis of acne vulgaris to anti-acne agents. *Archives of Dermatological Research*, 311, 337–349.
- Corvec, S., Dagnelie, M.-A., Khammari, A. & Dréno, B. (2019). Taxonomy and phylogeny of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* in inflammatory skin diseases. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 146, 26–30.
- Cosmetics Europe. (2019). Socio-Economic Contribution of the European Cosmetics Industry.
- Costa, C., Alves, A., Pinto, P.R., Sousa, R.A., Borges da Silva, E.A., Reis, R.L. & Rodrigues, A.E. (2012). Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure. *Carbohydrate Polymers*, 88, 537–546.
- Coste, O., Malta, E., López, J.C. & Fernández-Díaz, C. (2015). Production of sulfated oligosaccharides from the seaweed *Ulva* sp. using a new ulvan-degrading enzymatic bacterial crude extract. *Algal Research*, 10, 224–231.
- Costello, E.K., Lauber, C.L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J.I. & Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326, 1694–1697.
- Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C. & Ehrlich, G. (2003). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 1466–1477.
- Couteau, C. & Coiffard, L. (2016). Seaweed application in cosmetics. Fleurence, J. & Levine, I. (eds). *Seaweed in Health and Disease Prevention*. Academic Press, London, United Kingdom, 423–441.
- Couteau, C. & Coiffard, L. (2020). Phycocosmetics and Other Marine Cosmetics, Specific Cosmetics Formulated Using Marine Resources. *Marine Drugs*, 18, 322.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í. & Penadés, J.R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183, 2888–2896.
- Cui, N., Hu, M. & Khalil, R.A. (2017). Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V., 1–73.
- Cui, J., Li, Y., Wang, S., Chi, Y., Hwang, H. & Wang, P. (2018). Directional preparation of anticoagulant-active sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* using artificial neural networks. *Scientific Reports*, 8, 3062.
- Dagnelie, M.-A., Corvec, S., Saint-Jean, M., Bourdès, V., Nguyen, J.-M., Khammari, A. & Dréno, B. (2017). La sévérité de l'acné est associée à une perte de la diversité des souches de *Propionibacterium acnes* en peau acnéique. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 144, S130.
- Dagnelie, M.-A., Corvec, S., Saint-Jean, M., Bourdès, V., Nguyen, J.M., Khammari, A. & Dréno, B. (2018). Decrease in diversity of *Propionibacterium acnes* phylotypes in patients with severe acne on the back. *Acta Dermato-Venereologica*, 98, 262–267.

- Dagnelie, M.-A., Corvec, S., Saint-Jean, M., Nguyen, J.M., Khammari, A. & Dréno, B. (2019). *Cutibacterium acnes* phylotypes diversity loss: a trigger for skin inflammatory process. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 33, 2340–2348.
- Dale, B.A., Gown, A.M., Fleckman, P., Kimball, J.R. & Resing, K.A. (1987). Characterization of two monoclonal antibodies to human epidermal keratohyalin: Reactivity with filaggrin and related proteins. *Journal of Investigative Dermatology*, 88, 306–313.
- David-Raoudi, M., Tranchepain, F., Deschrevel, B., Vincent, J.C., Bogdanowicz, P., Boumediene, K. & Pujol, J.P. (2008). Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: Relation to wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16, 274–287.
- David Boothe, W., Tarbox, J.A. & Tarbox, M.B. (2017). Atopic Dermatitis: Pathophysiology. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1027, 21–37.
- Dawczynski, C., Schubert, R. & Jahreis, G. (2007). Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*, 103, 891–899.
- Dayan, G.H., Mohamed, N., Scully, I.L., Cooper, D., Begier, E., Eiden, J., Jansen, K.U., Gurtman, A. & Anderson, A.S. (2016). *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. *Expert Review of Vaccines*, 15, 1373–1392.
- de Araújo, I.W.F., Rodrigues, J.A.G., Quinderé, A.L.G., Silva, J. de F.T., Maciel, G. de F., Ribeiro, N.A., de Sousa Oliveira Vanderlei, E., Ribeiro, K.A., Chaves, H.V., Pereira, K.M.A., Bezerra, M.M. & Benevides, N.M.B. (2016). Analgesic and anti-inflammatory actions on bradykinin route of a polysulfated fraction from alga *Ulva lactuca*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 820–830.
- De Casabianca, M.L., Barthelemy, N., Serrano, O. & Sfriso, A. (2002). Growth rate of *Ulva rigida* in different Mediterranean eutrophicated sites. *Bioresource Technology*, 82, 27–31.
- De Jesus Raposo, M.F., De Morais, A.M.M.B. & De Morais, R.M.S.C. (2016). Emergent sources of prebiotics: Seaweeds and microalgae. *Marine Drugs*, 14, 27.
- de Reviere, B. (2002). Biologie et phylogénie des algues - Tome 1 et 2.
- Delattre, C., Michaud, P., Courtois, B. & Courtois, J. (2005). Oligosaccharides engineering from plants and algae - Applications in Biotechnology and therapeutic. *Minerva Biotec*, 17, 107–117.
- Delavary, B.M., van der Veer, W.M., van Egmond, M., Niessen, F.B. & Beelen, R.H.J. (2011). Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*, 216, 753–762.
- Deniaud-Bouët, E., Kervarec, N., Michel, G., Tonon, T., Kloareg, B. & Hervé, C. (2014). Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: Insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. *Annals of Botany*, 114, 1203–1216.
- Deniaud-Bouët, E., Hardouin, K., Potin, P., Kloareg, B. & 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.
- Denton, C.P. & Abraham, D.J. (2001). Transforming growth factor- $\beta$  and connective tissue growth factor: Key cytokines in scleroderma pathogenesis. *Current Opinion in Rheumatology*, 13, 505–511.
- Denton, C.P. & Black, C.M. (2005). Targeted therapy comes of age in scleroderma. *Trends in Immunology*, 26, 596–602.
- Denton, C.P., Black, C.M. & Abraham, D.J. (2006). Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2, 134–144.

- Desmoulière, A., Chaponnier, C. & Gabbiani, G. (2005). Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair and Regeneration*, 13, 7–12.
- Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M. & Relman, D.A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on humang-microbe mutualism and disease. *Nature*, 449, 811–818.
- Dhawans, J., Lichtlerq, A.C., Roweq, D.W. & Farmerst, S.R. (1991). Cell Adhesion Regulates Pro- $\alpha$ (1) Collagen mRNA Stability and Transcription in Mouse Fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 8470–8475.
- Di Domizio, J., Pagnoni, A., Huber, M., Hohl, D. & Gilliet, M. (2016). The skin microbiota: a colossus steps into the spotlight. *Revue Medicale Suisse*, 12, 660–4.
- Dijke, P. Ten. & Hill, C.S. (2004). New insights into TGF- $\beta$ -Smad signalling. *Trends in Biochemical Sciences*, 29, 265–273.
- Dion, P., de Reviers, B. & Coat, G. (1992). *Ulva armoricana* sp. nov. (Ulvales, Chlorophyta) from the coasts of Brittany (France). I. Morphological identification. *European Journal of Phycology*, 33, 73–80.
- Domozych, D.S., Ciancia, M., Fangel, J.U., Mikkelsen, M.D., Ulvskov, P. & Willats, W.G.T. (2012). The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity. *Frontiers in Plant Science*, 3, 82.
- Dong, C., Zhu, S., Wang, T., Yoon, W., Li, Z., Alvarez, R.J., Ten Dijke, P., White, B., Wigley, F.M. & Goldschmidt-Clermont, P.J. (2002). Deficient Smad7 expression: A putative molecular defect in scleroderma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 3908–3913.
- Dong, K.K., Damaghi, N., Picart, S.D., Markova, N.G., Obayashi, K., Okano, Y., Masaki, H., Grether-Beck, S., Krutmann, J., Smiles, K.A. & Yarosh, D.B. (2008). UV-induced DNA damage initiates release of MMP-1 in human skin. *Experimental Dermatology*, 17, 1037–1044.
- Douglas, H.C. & Gunter, S.E. (1946). The Taxonomic Position of *Corynebacterium acnes*. *Journal of Bacteriology*, 52, 15–23.
- Downer, R., Roche, F., Park, P.W., Mecham, R.P. & Foster, T.J. (2002). The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 243–250.
- Downing, D.T., Stewart, M.E., Wertz, P.W. & Strauss, J.S. (1986). Essential fatty acids and acne. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 14, 221–225.
- Dréno, B. (2008). Anatomie, immunologie de la peau et de ses annexes. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 135, S149–S152.
- Dréno, B., Araviiskaia, E., Berardesca, E., Gontijo, G., Sanchez Viera, M., Xiang, L.F., Martin, R. & Bieber, T. (2016). Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 30, 2038–2047.
- Dréno, B. (2017). What is new in the pathophysiology of acne, an overview. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31, 8–12.
- Dréno, B., Martin, R., Moyal, D., Henley, J.B., Khammari, A. & Seité, S. (2017). Skin microbiome and acne vulgaris: Staphylococcus, a new actor in acne. *Experimental Dermatology*, 26, 798–803.
- Duan, J. & Kasper, D.L. (2011). Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology*, 21, 401–409.

- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.
- Eckes, B., Mauch, C., Hüppe, G. & Krieg, T. (1996). Differential regulation of transcription and transcript stability of pro- $\alpha$ 1(I) collagen and fibronectin in activated fibroblasts derived from patients with systemic scleroderma. *Biochemical Journal*, 315, 549–554.
- Edwards, D.R., Murphy, G., Reynolds, J.J., Whitham, S.E., Docherty, A.J., Angel, P. & Heath, J.K. (1987). Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *The EMBO Journal*, 6, 1899–1904.
- Edwards, A.M., Potter, U., Meenan, N.A.G., Potts, J.R. & Massey, R.C. (2011). *Staphylococcus aureus* Keratinocyte Invasion Is Dependent upon Multiple High-Affinity Fibronectin-Binding Repeats within FnBPA. *PLoS ONE*, 6, e18899.
- Eggert, A. & Karsten, U. (2010). Low Molecular Weight Carbohydrates in Red Algae – an Ecophysiological and Biochemical Perspective. Seckbach, J. & Chapman, D. (eds). *Red Algae in the Genomic Age. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, Springer. Dordrecht, 443–456.
- Eldhin, D.N., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Höök, M. & Foster, T.J. (1998). Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 30, 245–257.
- Enault, J., Saguet, T., Yvergnaux, F. & Feuilloley, M.G.J. (2014). PS291<sup>®</sup>, a rhamnose-rich polysaccharide obtained by fermentation, is reducing *Propionibacterium acnes* adhesion and biofilm formation activity. *International Federation of Societies of Cosmetic Chemists*, 2801–2810.
- Ennamany, R., Saboureau, D., Mekideche, N. & Creppy, E.E. (1998). SECMA 1<sup>®</sup>, a mitogenic hexapeptide from *Ulva* algae modulates the production of proteoglycans and glycosaminoglycans in human foreskin fibroblast. *Human & Experimental Toxicology*, 17, 18–22.
- Estevez, J.M., Fernández, P.V., Kasulin, L., Dupree, P. & Ciancia, M. (2009). Chemical and *in situ* characterization of macromolecular components of the cell walls from the green seaweed *Codium fragile*. *Glycobiology*, 19, 212–228.
- Falcao, B., Vishwakarma, J., Jadav, H. & Vavilala, S.L. (2020). *In Vitro* Evaluation of The Antioxidant and Anti-Skin Aging Properties of Green Algal Sulfated Polysaccharides. *Archives of Microbiology & Immunology*, 4, 75–90.
- FAO. (2018). The Global Status of Seaweed Production, Trade and Utilization. *Globefish Research Programme*, 124, 1–120.
- Faury, G., Ruzsova, E., Molinari, J., Mariko, B., Raveaud, S., Velebny, V. & Robert, L. (2008). The  $\alpha$ -l-Rhamnose recognizing lectin site of human dermal fibroblasts functions as a signal transducer: Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes and gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780, 1388–1394.
- Faury, G., Molinari, J., Rusova, E., Mariko, B., Raveaud, S., Huber, P., Velebny, V., Robert, A.M. & Robert, L. (2011). Receptors and aging: Structural selectivity of the rhamnose-receptor on fibroblasts as shown by  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilization and gene-expression profiles. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 53, 106–112.
- Fernández-Díaz, C., Coste, O. & Malta, E. (2017). Polymer chitosan nanoparticles functionalized with *Ulva ohnoi* extracts boost *in vitro* ulvan immunostimulant effect in *Solea senegalensis* macrophages. *Algal Research*, 26, 135–142.



- Fernando, I.P.S., Kim, K.N., Kim, D. & Jeon, Y.J. (2018a). Algal polysaccharides: potential bioactive substances for cosmeceutical applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39, 99–113.
- Fernando, I.P.S., Asanka Sanjeewa, K.K., Samarakoon, K.W., Kim, H.S., Gunasekara, U.K.D.S.S., Park, Y.-J., Abeyunga, D.T.U., Lee, W.W. & Jeon, Y.J. (2018b). The potential of fucoidans from *Chnoospora minima* and *Sargassum polycystum* in cosmetics: antioxidant, anti-inflammatory, skin-whitening, and antiwrinkle activities. *Journal of Applied Phycology*, 30, 3223–3232.
- Fernando, I.P.S., Jayawardena, T.U., Sanjeewa, K.K.A., Wang, L., Jeon, Y.-J. & Lee, W.W. (2018c). Anti-inflammatory potential of alginic acid from *Sargassum horneri* against urban aerosol-induced inflammatory responses in keratinocytes and macrophages. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 160, 24–31.
- Fernando, I.P.S., Dias, M.K.H.M., Madusanka, D.M.D., Han, E.J., Kim, M.J., Jeon, Y.-J. & Ahn, G. (2020). Fucoidan refined by *Sargassum confusum* indicate protective effects suppressing photo-oxidative stress and skin barrier perturbation in UVB-induced human keratinocytes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 149–161.
- Feuillolay, C., Pecastaings, S., Gac, C. Le., Fiorini-Puybaret, C., Luc, J., Joulia, P. & Roques, C. (2016). A *Myrtus communis* extract enriched in myrtucummulones and ursolic acid reduces resistance of *Propionibacterium acnes* biofilms to antibiotics used in acne vulgaris. *Phytomedicine*, 23, 307–315.
- Feuilloley, M.G.J. (2018). Antidromic neurogenic activity and cutaneous bacterial flora. *Seminars in Immunopathology*, 50, 281–289.
- Feussner, I. & Wasternack, C. (2002). The Lipoxygenase Pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 275–297.
- Fey, P.D. & Olson, M.E. (2010). Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future microbiology*, 5, 917–33.
- Ficko-Blean, E., Hervé, C. & Michel, G. (2015). Sweet and sour sugars from the sea: the biosynthesis and remodeling of sulfated cell wall polysaccharides from marine macroalgae. *Perspectives in Phycology*, 2, 51–64.
- Figueiroa Careta, M. & Romiti, R. (2015). Localized scleroderma: clinical spectrum and therapeutic update. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 90, 62–73.
- Filaire, E., Vialleix, C., Cadoret, J.-P., Dreux, A. & Berthon, J.-Y. (2019a). ExpoZen®: an active ingredient modulating reactive and sensitive skin microbiota.
- Filaire, E., Vialleix, C., Cadoret, J.-P., Guénard, S., Muller, C., Dreux-Zigha, A. & Berthon, J.-Y. (2019b). Characterization of Reactive and Sensitive Skin Microbiota: Effect of *Halymenia durvillei* (HD) Extract Treatment. *Cosmetics*, 6, 69.
- Filisetti-Cozzi, T.M. & Carpita, N.C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical biochemistry*, 197, 157–62.
- Findley, K., Oh, J., Yang, J., Conlan, S., Deming, C., Meyer, J.A., Schoenfeld, D., Nomicos, E., Park, M., Kong, H.H., Segre, J.A. & Segre, J.A. (2013). Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*, 498, 367–370.
- Fischer, J. (1996). Drug-induced glycosaminoglycan storage: Dose-dependent changes in the pattern of accumulated glycosaminoglycans in cultured bovine and human fibroblasts. *Biochemical Pharmacology*, 52, 1331–1337.

- Fitton, J., Dell'Acqua, G., Gardiner, V.-A., Karpinić, S., Stringer, D. & Davis, E. (2015). Topical Benefits of Two Fucoïdan-Rich Extracts from Marine Macroalgae. *Cosmetics*, 2, 66–81.
- Fitz-Gibbon, S., Tomida, S., Chiu, B.-H., Nguyen, L., Du, C., Liu, M., Elashoff, D., Erfe, M.C., Loncaric, A., Kim, J., Modlin, R.L., Miller, J.F., Sodergren, E., Craft, N., Weinstock, G.M. & Li, H. (2013). *Propionibacterium acnes* strain populations in the human skin microbiome associated with acne. *Journal of Investigative Dermatology*, 133, 2152–2160.
- Fleurence, J. & Levine, I.A. (2016). Seaweed in health and disease prevention. 480 p.
- Fleurence, J., Moraçais, M. & Dumay, J. (2018). Seaweed proteins. *Proteins in Food Processing: Second Edition*. Elsevier Inc., 245–262.
- Fligiel, S.E.G., Varani, J., Datta, S.C., Kang, S., Fisher, G.J. & Voorhees, J.J. (2003). Collagen degradation in aged/photodamaged skin *in vivo* and after exposure to matrix metalloproteinase-1 *in vitro*. *Journal of Investigative Dermatology*, 120, 842–848.
- Fort, A., Mannion, C., Fariñas-Franco, J.M. & Sulpice, R. (2020). Green tides select for fast expanding *Ulva* strains. *Science of the Total Environment*, 698, 134337.
- Foster, T.J. & Höök, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 6, 484–488.
- Foulongne, V., Sauvage, V., Hebert, C., Dereure, O., Cheval, J., Gouilh, M.A., Pariente, K., Segondy, M., Burguière, A., Manuguerra, J.-C., Caro, V. & Eloit, M. (2012). Human Skin Microbiota: High Diversity of DNA Viruses Identified on the Human Skin by High Throughput Sequencing. *PLoS ONE*, 7, e38499.
- Fournière, M., Latire, T., Lang, M., Terme, N., Bourgougnon, N. & Bedoux, G. (2019). Production of Active Poly- and Oligosaccharidic Fractions from *Ulva* sp. by Combining Enzyme-Assisted Extraction (EAE) and Depolymerization. *Metabolites*, 9, 182.
- Fournière, M., Latire, T., Souak, D., Feuilloley, M.G.J. & Bedoux, G. (2020). *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*: Two Major Sentinels of Skin Microbiota and the Influence of Cosmetics. *Microorganisms*, 8, 1752.
- Freitas, R., Martins, A., Silva, J., Alves, C., Pinteus, S., Alves, J., Teodoro, F., Ribeiro, H.M., Gonçalves, L., Petrovski, Ž., Branco, L. & Pedrosa, R. (2020). Highlighting the Biological Potential of the Brown Seaweed *Fucus spiralis* for Skin Applications. *Antioxidants*, 9, 611.
- Frenard, C., Dagnelie, M.A., Khammari, A., Saint-Jean, M., Boisrobert, A., Corvec, S. & Dreno, B. (2018). Do *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus* define two different types of folliculitis?: Bacteriological study of scalp folliculitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 32, e266–e268.
- Gabrielli, A., Avvedimento, E. V. & Krieg, T. (2009). Mechanisms of Disease Scleroderma. *The New England Journal of Medicine*, 360, 1989–2003.
- Gadenne, V., Lebrun, L., Jouenne, T. & Thebault, P. (2015). Role of molecular properties of ulvans on their ability to elaborate antiadhesive surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103, 1021–1028.
- Gaidarova, S. & Jiménez, S.A. (2002). Inhibition of basal and transforming growth factor- $\beta$ -induced stimulation of *COL1A1* transcription by the DNA intercalators, mitoxantrone and WP631, in cultured human dermal fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 38737–38745.

- Gailit, J., Clarke, C., Newman, D., Tonnesen, M.G., Mosesson, M.W. & Clark, R.A.F. (1997). Human fibroblasts bind directly to fibrinogen at RGD sites through integrin  $\alpha v\beta 3$ . *Experimental Cell Research*, 232, 118–126.
- Galéra, P., Desbois, C., Ducy, P. & Karsenty, G. (1994). La régulation de l'expression des gènes du collagène de type I : implication pour l'étude de la sclérodémie. *Médecine/Sciences*, 12, 1253–1262.
- Gallo, R.L. & Nakatsuji, T. (2011). Microbial Symbiosis with the Innate Immune Defense System of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 131, 1974–1980.
- Gan, Q.-F., Browner, M.F., Sloane, D.L. & Sigal, E. (1996). Defining the Arachidonic Acid Binding Site of Human 15-Lipoxygenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 25412–25418.
- Gandhi, N.S. & Mancera, R.L. (2008). The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chemical Biology & Drug Design*, 72, 455–482.
- Gannesen, A.V., Lesouhaitier, O., Racine, P.-J., Barreau, M., Netrusov, A.I., Plakunov, V.K. & Feuilleley, M.G.J. (2018a). Regulation of Monospecies and Mixed Biofilms Formation of Skin *Staphylococcus aureus* and *Cutibacterium acnes* by Human Natriuretic Peptides. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2912.
- Gannesen, A.V., Lesouhaitier, O., Netrusov, A.I., Plakunov, V.K. & Feuilleley, M.G.J. (2018b). Regulation of Formation of Monospecies and Binary Biofilms by Human Skin Microbiota Components, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*, by Human Natriuretic Peptides. *Microbiology*, 87, 597–609.
- Gannesen, A.V., Borrel, V., Lefeuvre, L., Netrusov, A.I., Plakunov, V.K. & Feuilleley, M.G.J. (2018c). Effect of two cosmetic compounds on the growth, biofilm formation activity, and surface properties of acneic strains of *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. *MicrobiologyOpen*, 8, e00659.
- Gao, Z., Perez-Perez, G.I., Chen, Y. & Blaser, M.J. (2010). Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 3575–3581.
- Gao, G., Clare, A.S., Rose, C. & Caldwell, G.S. (2017). Eutrophication and warming-driven green tides (*Ulva rigida*) are predicted to increase under future climate change scenarios. *Marine Pollution Bulletin*, 114, 439–447.
- Garcia-Vaquero, M., Rajauria, G., O'Doherty, J.V. & Sweeney, T. (2017). Polysaccharides from macroalgae: Recent advances, innovative technologies and challenges in extraction and purification. *Food Research International*, 99, 1011–1020.
- Garon-Lardièrre, S. (2004). Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales). Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale - Spécialité Chimie. Soutenue le 24 février 2004 à Brest.
- Geipel, U. (2009). Pathogenic organisms in hip joint infections. *International Journal of Medical Sciences*, 6, 234–240.
- Gelse, K., Pöschl, E. & Aigner, T. (2003). Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 1531–1546.
- Geras, A.J. (1990). Dermatology : A medical artist's interpretation. 139 p. *Sandoz Medical Publications, Sandoz Pharma Ltd.*
- Gertler, A. & Feinstein, G. (1971). Inhibition of porcine elastase by turkey ovomucoid and chicken ovomucoid. *European Journal of Biochemistry*, 20, 547–52.



- Gilbane, A.J., Denton, C.P. & Holmes, A.M. (2013). Scleroderma pathogenesis: A pivotal role for fibroblasts as effector cells. *Arthritis Research and Therapy*, 15, 215.
- Gilda, J.E. & Gomes, A. V. (2013). Stain-Free total protein staining is a superior loading control to b-actin for Western blots. *Analytical Biochemistry*, 440, 186–188.
- Glasson, C.R.K., Sims, I.M., Carnachan, S.M., de Nys, R. & Magnusson, M. (2017). A cascading biorefinery process targeting sulfated polysaccharides (ulvan) from *Ulva ohnoi*. *Algal Research*, 27, 383–391.
- Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R. & Frey, W. (2013). Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Research*, 2, 401–408.
- Golebiewska, E.M. & Poole, A.W. (2015). Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Reviews*, 29, 153–162.
- Gómez, M.I., Lee, A., Reddy, B., Muir, A., Soong, G., Pitt, A., Cheung, A. & Prince, A. (2004). *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nature Medicine*, 10, 842–848.
- Gonzalez, T., Biagini Myers, J.M., Herr, A.B. & Khurana Hershey, G.K. (2017). Staphylococcal Biofilms in Atopic Dermatitis. *Current Allergy and Asthma Reports*, 17, 81.
- Grange, P.A., Raingeaud, J., Calvez, V. & Dupin, N. (2009). Nicotinamide inhibits *Propionibacterium acnes*-induced IL-8 production in keratinocytes through the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways. *Journal of Dermatological Science*, 56, 106–112.
- Grazul-Bilska, A.T., Johnson, M.L., Bilski, J.J., Redmer, D.A., Reynolds, L.P., Abdullah, A. & Abdullah, K.M. (2003). Wound healing: The role of growth factors. *Drugs of Today*, 39, 787–800.
- Green, K.J. & Jones, J.C.R. (1997). Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *Clinical Experimental Dermatology*, 107, 9–15.
- Greenwel, P., Tanaka, S., Penkov, D., Zhang, W., Olive, M., Moll, J., Vinson, C., Di Liberto, M. & Ramirez, F. (2000). Tumor Necrosis Factor Alpha Inhibits Type I Collagen Synthesis through Repressive CCAAT/Enhancer-Binding Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 20, 912–918.
- Grice, E.A., Kong, H.H., Conlan, S., Deming, C.B., Davis, J., Young, A.C., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Murray, P.R., Green, E.D., Turner, M.L., Segre, J.A. & Segre, J.A. (2009). Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science*, 324, 1190–1192.
- Grice, E.A. & Segre, J.A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 244–253.
- Grice, E.A. (2015). The intersection of microbiome and host at the skin interface: genomic- and metagenomic-based insights. *Genome Research*, 25, 1514–1520.
- Grosso, C., Valentão, P., Ferreres, F. & Andrade, P.B. (2015). Alternative and Efficient Extraction Methods for Marine-Derived Compounds. *Marine Drugs*, 13, 3182–3230.
- Guidara, M., Yaich, H., Amor, I. Ben., Fakhfakh, J., Gargouri, J., Lassoued, S., Blecker, C., Richel, A., Attia, H. & Garna, H. (2021). Effect of extraction procedures on the chemical structure, antitumor and anticoagulant properties of ulvan from *Ulva lactuca* of Tunisia coast. *Carbohydrate Polymers*, 253, 117283.
- Guillerme, J.-B., Couteau, C. & Coiffard, L. (2017). Applications for marine resources in cosmetics. *Cosmetics*, 4, 35.

- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2020. (2020). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.
- Günzel, S., Weidenthaler, B., Haufler, I. & Anton-Lamprecht, I. (1991). Keratohyalin granules are heterogeneous in ridged and non-ridged human skin: evidence from anti-filaggrin immunogold labelling of normal skin and skin of autosomal dominant ichthyosis vulgaris patients. *Archives of Dermatological Research*, 282, 421–432.
- Gurpilhares, D. de B., Moreira, T.R., Bueno, J. da L., Cinelli, L.P., Mazzola, P.G., Pessoa, A. & Sette, L.D. (2016). Algae's sulfated polysaccharides modifications: Potential use of microbial enzymes. *Process Biochemistry*, 51, 989–998.
- Gürtler, A., Kunz, N., Gomolka, M., Hornhardt, S., Friedl, A.A., McDonald, K., Kohn, J.E. & Posch, A. (2013). Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Analytical Biochemistry*, 433, 105–111.
- Haeggström, J.Z. & Funk, C.D. (2011). Lipoxygenase and leukotriene pathways: Biochemistry, biology, and roles in disease. *Chemical Reviews*, 111, 5866–5896.
- Haensel, D. & Dai, X. (2018). Epithelial-to-mesenchymal transition in cutaneous wound healing: Where we are and where we are heading. *Developmental Dynamics*, 247, 473–480.
- Handel, T.M., Johnson, Z., Crown, S.E., Lau, E.K., Sweeney, M. & Proudfoot, A.E. (2005). Regulation of protein function by glycosaminoglycans - As exemplified by chemokines. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 385–410.
- Hardouin, K., Bedoux, G., Burlot, A.S., Nyvall-Collén, P. & Bourgougnon, N. (2014a). Enzymatic recovery of metabolites from seaweeds: Potential applications. Bourgougnon, N. (ed). *Advances in Botanical Research - Sea Plants*. Academic Press, London, United Kingdom, 281–323.
- Hardouin, K., Burlot, A.-S., Umami, A., Tanniou, A., Stiger-Pouvreau, V., Widowati, I., Bedoux, G. & Bourgougnon, N. (2014b). Biochemical and antiviral activities of enzymatic hydrolysates from different invasive French seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 26, 1029–1042.
- Hardouin, K. (2015). Production d'extraits aqueux à partir d'*Ulva* sp., au moyen de procédés d'hydrolyse enzymatique: caractérisation, valorisation et perspectives de développement. Thèse de l'Université de Bretagne Sud - Spécialité Biologie Marine. Soutenue le 30 juin 2015 à Vannes.
- Hardouin, K., Bedoux, G., Burlot, A.-S., Donnay-Moreno, C., Bergé, J.-P., Nyvall-Collén, P. & Bourgougnon, N. (2016). Enzyme-assisted extraction (EAE) for the production of antiviral and antioxidant extracts from the green seaweed *Ulva armoricana* (Ulvales, Ulvophyceae). *Algal Research*, 16, 233–239.
- Harley, C.B., Fitcher, A.B. & Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345, 458–460.
- Harrysson, H., Hayes, M., Eimer, F., Carlsson, N.G., Toth, G.B. & Undeland, I. (2018). Production of protein extracts from Swedish red, green, and brown seaweeds, *Porphyra umbilicalis* Kützinger, *Ulva lactuca* Linnaeus, and *Saccharina latissima* (Linnaeus) J. V. Lamouroux using three different methods. *Journal of Applied Phycology*, 30, 3565–3580.
- Hayakawa, T. & Yamashita, K. (2003). Structures and Functions of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Extracellular Matrix and the Liver*. Academic Press, 309–329.
- Haydont, V., Bernard, B.A. & Fortunel, N.O. (2019). Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics. *Mechanisms of Ageing and Development*, 177, 150–156.

- Hedman, K., Kurkinen, M., Alitalo, K., Vaheri, A., Johansson, S. & Höök, M. (1979). Isolation of the pericellular matrix of human fibroblast cultures. *Journal of Cell Biology*, 81, 83–91.
- Heilmann, C. (2011). Adhesion Mechanisms of Staphylococci. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 715, 105–123.
- Henriksen, K. & Karsdal, M.A. (2019). Type I collagen. Karsdal, M.A. (ed). *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin: Structure, Function and Biomarkers*, Second. Elsevier, 1–12.
- Hentati, F., Tounsi, L., Djomdi, D., Pierre, G., Delattre, C., Ursu, A.V., Fendri, I., Abdelkafi, S. & Michaud, P. (2020). Bioactive Polysaccharides from Seaweeds. *Molecules*, 25, 3152.
- Heo, S.-J., Lee, K.-W., Song, C.B. & Jeon, Y.-J. (2003). Antioxydant Activity of Enzymatic Extracts from Brown Seaweeds. *Algae*, 18, 71–81.
- Hernández-Garibay, E., Zertuche-González, J.A. & Pacheco-Ruiz, I. (2011). Isolation and chemical characterization of algal polysaccharides from the green seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. *Journal of Applied Phycology*, 23, 537–542.
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B.K. & Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 146, 2395–2407.
- Higaki, S., Kitagawa, T., Kagoura, M., Morohashi, M. & Yamagishi, T. (2000). Correlation between *Propionibacterium acnes* Biotypes, Lipase Activity and Rash Degree in Acne Patients. *The Journal of Dermatology*, 27, 519–522.
- Hillion, M. (2013). Interactions peau/microbiote cutané: étude du microbiote cutané cultivable et influence de produits cosmétiques sur la virulence bactérienne. Apports de la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF. Thèse de l'Université de Rouen - Spécialité Microbi. Soutenue le 11 janvier 2013 à Rouen.
- Hirao, T., Aoki, H., Yoshida, T., Sato, Y. & Kamoda, H. (1996). Elevation of interleukin 1 receptor antagonist in the stratum corneum of sun-exposed and ultraviolet B-irradiated human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 106, 1102–1107.
- Hirasawa, Y., Takai, T., Nakamura, T., Mitsuishi, K., Gunawan, H., Suto, H., Ogawa, T., Wang, X.L., Ikeda, S., Okumura, K. & Ogawa, H. (2010). *Staphylococcus aureus* extracellular protease causes epidermal barrier dysfunction. *Journal of Investigative Dermatology*, 130, 614–617.
- Holdt, S. & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 543–597.
- Holland, K.T. & Bojar, R.A. (2002). Cosmetics: what is their influence on the skin microflora? *American Journal of Clinical Dermatology*, 3, 445–449.
- Holland, C., Mak, T.N., Zimny-Arndt, U., Schmid, M., Meyer, T.F., Jungblut, P.R. & Brüggemann, H. (2010). Proteomic identification of secreted proteins of *Propionibacterium acnes*. *BMC Microbiology*, 10, 230.
- Holmberg, A., Lood, R., Mörgelin, M., Söderquist, B., Holst, E., Collin, M., Christensson, B. & Rasmussen, M. (2009). Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 787–795.
- Hon, K.L., Tsang, Y.C.K., Pong, N.H., Leung, T.F. & Ip, M. (2016). Exploring *Staphylococcus epidermidis* in atopic eczema: friend or foe? *Clinical and Experimental Dermatology*, 41, 659–663.

- Honnegowda, T.M., Kumar, P., Udapa, E.G.P., Kumar, S., Kumar, U. & Rao, P. (2015). Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing. *Plastic and Aesthetic Research*, 2, 243–249.
- Hwang, P.A., Yan, M. De., Kuo, K.L., Phan, N.N. & Lin, Y.C. (2017). A mechanism of low molecular weight fucoidans degraded by enzymatic and acidic hydrolysis for the prevention of UVB damage. *Journal of Applied Phycology*, 29, 521–529.
- Ihn, H., Yamane, K., Kubo, M. & Tamaki, K. (2001). Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. *Arthritis & Rheumatology*, 44, 474–480.
- Ihn, H. (2008). Autocrine TGF- $\beta$  signaling in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Journal of Dermatological Science*, 49, 103–113.
- International Union of Biochemistry and Molecular Biology. (2021). Enzyme Nomenclature. <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>
- Ionescu, M.-A.A., Feuilloley, M.G.J., Enault, J., Saguet, T., Robert, G. & Lefeuvre, L. (2015). La modulation du microbiotum et du *P. acnes* ribotypes 4 et 5 dans l'acné polymorphe : étude microbiologique *in vitro* et essai clinique dans une série de 70 cas. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 142, S434–S435.
- Isnard, N., Fodil-Bourahla, I., Robert, A.M. & Robert, L. (2004). Pharmacology of skin aging. Stimulation of glycosaminoglycan biosynthesis by L-fucose and fucose-rich polysaccharides, effect of *in vitro* aging of fibroblasts. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 58, 202–204.
- Ivanov, V., Ivanova, S., Niedzwiecki, A. & Rath, M. (2016). Seaweed derived polysaccharide fucoidan stimulates production and deposition of extracellular proteins and glycosaminoglycans by cultured human arterial wall resident cells. *Journal of Cellular Medicine and Natural Health*, 1–13.
- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T. & Mizunoe, Y. (2010). *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, 465, 346–349.
- Jahns, A.C., Lundskog, B., Ganceviciene, R., Palmer, R.H., Golovleva, I., Zouboulis, C.C., McDowell, A., Patrick, S. & Alexeyev, O.A. (2012). An increased incidence of *Propionibacterium acnes* biofilms in acne vulgaris: a case-control study. *British Journal of Dermatology*, 167, 50–58.
- Jaques, L.B., Ballieux, R.E., Dietrich, C.P. & Kavanagh, L.W. (1968). A microelectrophoresis method for heparin. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 46, 351–60.
- Jarrousse, V., Castex-Rizzi, N., Khammari, A., Charveron, M. & Dréno, B. (2007). Modulation of integrins and filaggrin expression by *Propionibacterium acnes* extracts on keratinocytes. *Archives of Dermatological Research*, 299, 441–447.
- Jaulneau, V., Lafitte, C., Jacquet, C., Fournier, S., Salamagne, S., Briand, X., Esquerré-Tugayé, M.T. & Dumas, B. (2010). Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 525291.
- Jelaska, A. & Korn, J.H. (2000). Role of apoptosis and transforming growth factor  $\beta$ 1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatism*, 43, 2230–2239.
- Jenkins, G. (2002). Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123, 801–10.

- Jeon, Y.J., Wijesinghe, W.A.J.P. & Kim, S.K. (2011). Enzyme-assisted Extraction and Recovery of Bioactive Components from Seaweeds. *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*, 221–228.
- Jesumani, V., Du, H., Aslam, M., Pei, P. & Huang, N. (2019a). Potential Use of Seaweed Bioactive Compounds in Skincare—A Review. *Marine Drugs*, 17, 688.
- Jesumani, V., Du, H., Pei, P., Zheng, C., Cheong, K.L. & Huang, N. (2019b). Unravelling property of polysaccharides from *Sargassum* sp. as an anti-wrinkle and skin whitening property. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 216–224.
- Jesumani, V., Du, H., Pei, P., Aslam, M. & Huang, N. (2020). Comparative study on skin protection activity of polyphenol-rich extract and polysaccharide-rich extract from *Sargassum vachellianum*. *PLOS ONE*, 15, e0227308.
- Jimenez, S.A., Varga, J., Olsen, A., Li, L., Diaz, A., Herhal, J. & Koch, J. (1994). Functional analysis of human  $\alpha 1(I)$  procollagen gene promoter. Differential activity in collagen-producing and -nonproducing cells and response to transforming growth factor  $\beta 1$ . *Journal of Biological Chemistry*, 269, 12684–12691.
- Jimenez, S.A. & Saitta, B. (1999). Alterations in the regulation of expression of the  $\alpha 1(I)$  collagen gene (*COL1A1*) in systemic sclerosis (scleroderma). *Springer Seminars in Immunopathology*, 21, 397–414.
- Johnson, T., Kang, D., Barnard, E. & Li, H. (2016). Strain-Level Differences in Porphyrin Production and Regulation in *Propionibacterium acnes* Elucidate Disease Associations. *mSphere*, 1, e00023-15.
- Jugeau, S., Tenaud, I., Knol, A.C., Jarrousse, V., Quereux, G., Khammari, A. & Dréno, B. (2005). Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *British Journal of Dermatology*, 153, 1105–1113.
- Jun, S.H., Lee, J.H., Kim, S.I., Choi, C.W., Park, T.I., Jung, H.R., Cho, J.W., Kim, S.H. & Lee, J.C. (2017). *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles exacerbate skin inflammation in atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 47, 85–96.
- Kadam, S.U., Tiwari, B.K. & O'Donnell, C.P. (2013). Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 4667–4675.
- Kadam, S., O'Donnell, C., Rai, D., Hossain, M., Burgess, C., Walsh, D. & Tiwari, B. (2015). Laminarin from Irish Brown Seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Laminaria hyperborea*: Ultrasound Assisted Extraction, Characterization and Bioactivity. *Marine Drugs*, 13, 4270–4280.
- Kähäri, V.-M. & Saarialho-Kere, U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Experimental Dermatology*, 6, 199–213.
- Kaisho, T. & Akira, S. (2006). Toll-like receptor function and signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 979–987.
- Kalsson, A. & Singh, S.K. (1999). Acid hydrolysis of sulphated polysaccharides. Desulphation and the effect on molecular mass. *Carbohydrate Polymers*, 38, 7–15.
- Kammeyer, A. & Luiten, R.M. (2015). Oxidation events and skin aging. *Ageing Research Reviews*, 21, 16–29.
- Karsenty, G. & de Crombrughe, B. (1991). Conservation of binding sites for regulatory factors in the coordinately expressed  $\alpha 1(I)$  and  $\alpha 2(I)$  collagen promoters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 177, 538–544.



- Kaur, P. & Li, A. (2000). Adhesive properties of human basal epidermal cells: An analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 114, 413–420.
- Kawakami, T., Ihn, H., Xu, W., Smith, E., LeRoy, C. & Trojanowska, M. (1998). Increased expression of TGF- $\beta$  receptors by scleroderma fibroblasts: Evidence for contribution of autocrine TGF- $\beta$  signaling to scleroderma phenotype. *Journal of Investigative Dermatology*, 110, 47–51.
- Kayser, H., Rodríguez-Ropero, F., Leitner, W., Fioroni, M. & De María, P.D. (2013). Mechanistic comparison of saccharide depolymerization catalyzed by dicarboxylic acids and glycosidases. *RSC Advances*, 3, 9273–9278.
- Kazir, M., Abuhassira, Y., Robin, A., Nahor, O., Luo, J., Israel, A., Golberg, A. & Livney, Y.D. (2019). Extraction of proteins from two marine macroalgae, *Ulva* sp. and *Gracilaria* sp., for food application, and evaluating digestibility, amino acid composition and antioxidant properties of the protein concentrates. *Food Hydrocolloids*, 87, 194–203.
- Kendel, M., Wielgosz-Collin, G., Bertrand, S., Roussakis, C., Bourgougnon, N. & Bedoux, G. (2015). Lipid composition, fatty acids and sterols in the seaweeds *Ulva armoricana*, and *Solieria chordalis* from Brittany (France): an analysis from nutritional, chemotaxonomic, and antiproliferative activity perspectives. *Marine Drugs*, 13, 5606–5628.
- Khmaladze, I., Butler, É., Fabre, S. & Gillbro, J.M. (2019). *Lactobacillus reuteri* DSM 17938—A comparative study on the effect of probiotics and lysates on human skin. *Experimental Dermatology*, 28, 822–828.
- Kidgell, J.T., Magnusson, M., de Nys, R. & Glasson, C.R.K. (2019). Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function. *Algal Research*, 39, 101422.
- Kidgell, J.T., Glasson, C.R.K., Magnusson, M., Vamvounis, G., Sims, I.M., Carnachan, S.M., Hinkley, S.F.R., Lopata, A.L., de Nys, R. & Taki, A.C. (2020). The molecular weight of ulvan affects the *in vitro* inflammatory response of a murine macrophage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 839–848.
- Kies, S., Vuong, C., Hille, M., Peschel, A., Meyer, C., Götz, F. & Otto, M. (2003). Control of antimicrobial peptide synthesis by the agr quorum sensing system in *Staphylococcus epidermidis*: Activity of the lantibiotic epidermin is regulated at the level of precursor peptide processing. *Peptides*, 24, 329–338.
- Kim, O.Y., Chae, J.S., Paik, J.K., Seo, H.S., Jang, Y., Cavallion, J.M. & Lee, J.H. (2012). Effects of aging and menopause on serum interleukin-6 levels and peripheral blood mononuclear cell cytokine production in healthy nonobese women. *Age*, 34, 415–425.
- Kim, S.K. & Chojnacka, K. (2015). Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Weinheim, Germany.
- Kim, M. & Park, H.J. (2016). Molecular Mechanisms of Skin Aging and Rejuvenation. Shiomi, N. (ed). *Molecular Mechanisms of the Aging Process and Rejuvenation*. InTech, 57–76.
- Kim, C.R., Kim, Y.M., Lee, M.K., Kim, I.H., Choi, Y.H. & Nam, T.J. (2017). *Pyropia yezoensis* peptide promotes collagen synthesis by activating the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway in the human dermal fibroblast cell line Hs27. *International Journal of Molecular Medicine*, 39, 31–38.
- Kim, J., Kim, B.E., Ahn, K. & Leung, D.Y.M. (2019). Interactions between atopic dermatitis and *Staphylococcus aureus* infection: Clinical implications. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 11, 593–603.

- Kinsella, M.G., Bressler, S.L. & Wight, T.N. (2004). The regulated synthesis of versican, decorin, and biglycan: Extracellular matrix proteoglycans that influence cellular phenotype. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 14, 203–234.
- 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 Annual Review*, 26, 259–315.
- Ko, H.J., Kim, G.B., Lee, D.H., Lee, G.S. & Pyo, H.B. (2013). The effect of hydrolyzed Jeju *Ulva pertusa* on the proliferation and type I collagen synthesis in replicative senescent fibroblasts. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 39, 177–186.
- Kocianova, S., Vuong, C., Yao, Y., Voyich, J.M., Fischer, E.R., DeLeo, F.R. & Otto, M. (2005). Key role of poly- $\gamma$ -DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 688–694.
- Kolaczowska, E. & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13, 159–175.
- Kon, A., Takeda, H., Ito, N., Hanada, K. & Takagaki, K. (2005). Tissue-specific downregulation of type VII collagen gene (*COL7A1*) transcription in cultured epidermal keratinocytes by ultraviolet A radiation (UVA) and UVA-inducible cytokines, with special reference to cutaneous photoaging. *Journal of Dermatological Science, Supplement*, 1, S29–S35.
- Kong, K.F., Vuong, C. & Otto, M. (2006). *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 133–139.
- Kong, H.H. & Segre, J.A. (2012). Skin Microbiome: Looking Back to Move Forward. *Journal of Investigative Dermatology*, 132, 933–939.
- Kong, H.H., Oh, J., Deming, C., Conlan, S., Grice, E.A., Beatson, M.A., Nomicos, E., Polley, E.C., Komarow, H.D., Murray, P.R., Turner, M.L., Segre, J.A. & Segre, J.A. (2012). Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Research*, 22, 850–859.
- Kornprobst, J.-M. (2005). Substances naturelles d'origine marine. 1830 p., Tec&Doc. *Lavoisier*.
- Kouba, D.J., Chung, K.Y., Nishiyama, T., Vindevoghel, L., Kon, A., Klement, J.F., Uitto, J. & Mauviel, A. (1999). Nuclear factor-kappa B mediates TNF-alpha inhibitory effect on alpha 2(I) collagen (*COL1A2*) gene transcription in human dermal fibroblasts. *The Journal of Immunology*, 162, 4226–4234.
- Kougias, P., Wei, D., Rice, P.J., Ensley, H.E., Kalbfleisch, J., Williams, D.L. & Browder, I.W. (2001). Normal human fibroblasts express pattern recognition receptors for fungal (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans. *Infection and Immunity*, 69, 3933–3938.
- Kristensen, J.H., Thorlacius-Ussing, J., Rønnow, S.R. & Karsdal, M.A. (2019). Elastin. Karsdal, M.A. (ed). *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin: Structure, Function and Biomarkers*, Second. Elsevier, Herlev, 265–273.
- Krutmann, J., Bouloc, A., Sore, G., Bernard, B.A. & Passeron, T. (2017). The skin aging exposome. *Journal of Dermatological Science*, 85, 152–161.
- Kubo, M., Ihn, H., Yamane, K. & Tamaki, K. (2001). Up-regulated expression of transforming growth factor  $\beta$  receptors in dermal fibroblasts in skin sections from patients with localized scleroderma. *Arthritis and Rheumatism*, 44, 731–734.

- Kubo, M., Ihn, H., Yamane, K. & Tamaki, K. (2002). Upregulated expression of transforming growth factor-beta receptors in dermal fibroblasts of skin sections from patients with systemic sclerosis. *The Journal of Rheumatology*, 29, 2558–2564.
- Kuehnast, T., Cakar, F., Weinhäupl, T., Pilz, A., Selak, S., Schmidt, M.A., Rüter, C. & Schild, S. (2018). Comparative analyses of biofilm formation among different *Cutibacterium acnes* isolates. *International Journal of Medical Microbiology*, 308, 1027–1035.
- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 30, 16–34.
- Kurihara, H., Kagawa, Y., Konno, R., Kim, S.M. & Takahashi, K. (2014). Lipoygenase inhibitors derived from marine macroalgae. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24, 1383–1385.
- Kwon, H.H., Yoon, J.Y., Park, S.Y. & Suh, D.H. (2013). Analysis of distribution patterns of *Propionibacterium acnes* phylotypes and *Peptostreptococcus* species from acne lesions. *British Journal of Dermatology*, 169, 1152–1155.
- Kwon, H.H. & Suh, D.H. (2016). Recent progress in the research about *Propionibacterium acnes* strain diversity and acne: pathogen or bystander? *International Journal of Dermatology*, 55, 1196–1204.
- Kypriotou, M., Beauchef, G., Chadjichristos, C., Widom, R., Renard, E., Jimenez, S.A., Korn, J., Maquart, F.X., Oddos, T., Von Stetten, O., Pujol, J.P. & Galéra, P. (2007). Human collagen Krox up-regulates type I collagen expression in normal and scleroderma fibroblasts through interaction with Sp1 and Sp3 transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 32000–32014.
- Lacey, N., Kavanagh, K. & Tseng, S.C.G. (2009). Under the lash: *Demodex* mites in human diseases. *The Biochemist*, 31, 20–24.
- Ladizinski, B., McLean, R., Lee, K.C., Elpern, D.J. & Eron, L. (2014). The human skin microbiome. *International Journal of Dermatology*, 53, 1177–1179.
- Lahaye, M. & Rochas, C. (1991). Chemical structure and physico-chemical properties of agar. *Hydrobiologia*, 221, 137–148.
- Lahaye, M. & Axelos, M.A.V. (1993). Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva* spp.). *Carbohydrate Polymers*, 22, 261–265.
- Lahaye, M. & Jegou, D. (1993). Chemical and physical-chemical characteristics of dietary fibres from *Ulva lactuca* (L.) Thuret and *Enteromorpha compressa* (L.) Grev. *Journal of Applied Phycology*, 5, 195–200.
- Lahaye, M., Jegou, D. & Buleon, A. (1994). Chemical characteristics of insoluble glucans from the cell wall of the marine green alga *Ulva lactuca* (L.) Thuret. *Carbohydrate Research*, 262, 115–125.
- Lahaye, M. & Ray, B. (1995). Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta). Extraction and chemical composition. *Carbohydrate Research*, 274, 251–261.
- Lahaye, M., Brunel, M. & Bonnin, E. (1997). Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (Ulvales, Chlorophyta). *Carbohydrate Research*, 304, 325–333.
- Lahaye, M., Inizan, F. & Vigoureux, J. (1998). NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan-boron complex formation. *Carbohydrate Polymers*, 36, 239–249.
- Lahaye, M., Alvarez-Cabal Cimadevilla, E., Kuhlenkamp, R., Quemener, B., Lognoné, V. & Dion, P. (1999). Chemical composition and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 11, 1–7.



- Lahaye, M. & Robic, A. (2007). Structure and functional properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8, 1765–1774.
- Lai-Cheong, J.E. & McGrath, J.A. (2017). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, 45, 347–351.
- Lai, Y., Di Nardo, A., Nakatsuji, T., Leichtle, A., Yang, Y., Cogen, A.L., Wu, Z.R., Hooper, L. V., Schmidt, R.R., Von Aulock, S., Radek, K.A., Huang, C.M., Ryan, A.F. & Gallo, R.L. (2009). Commensal bacteria regulate toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nature Medicine*, 15, 1377–1382.
- Lai, Y., Cogen, A.L., Radek, K.A., Park, H.J., MacLeod, D.T., Leichtle, A., Ryan, A.F., Di Nardo, A. & Gallo, R.L. (2010). Activation of TLR2 by a Small Molecule Produced by *Staphylococcus epidermidis* Increases Antimicrobial Defense against Bacterial Skin Infections. *Journal of Investigative Dermatology*, 130, 2211–2221.
- Lalegerie, F., Gager, L., Stiger-Pouvreau, V. & Connan, S. (2020). The stressful life of red and brown seaweeds on the temperate intertidal zone: effect of abiotic and biotic parameters on the physiology of macroalgae and content variability of particular metabolites. Bourgoignon, N. (ed). *Advances in Botanical Research - Seaweeds Around the World: State of Art and Perspectives*, Elsevier. Academic Press Inc., 247–287.
- Laronha, H. & Caldeira, J. (2020). Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells*, 9, 1076.
- Laronha, H., Carpinteiro, I., Portugal, J., Azul, A., Polido, M., Petrova, K.T., Salema-Oom, M. & Caldeira, J. (2020). Challenges in Matrix Metalloproteinases Inhibition. *Biomolecules*, 10, 717.
- Latire, T., Legendre, F., Bouyoucef, M., Marin, F., Carreiras, F., Rigot-Jolivet, M., Lebel, J.-M., Galéra, P. & Serpentine, A. (2017). Shell extracts of the edible mussel and oyster induce an enhancement of the catabolic pathway of human skin fibroblasts, *in vitro*. *Cytotechnology*, 69, 815–829.
- Le, K.Y. & Otto, M. (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1174.
- Le, B., Golokhvast, K.S., Yang, S.H. & Sun, S. (2019). Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Polysaccharides from *Ulva pertusa* and Evaluation of Their Antioxidant Activity. *Antioxidants*, 8, 129.
- Leask, A., Sa, S., Holmes, A., Shiwen, X., Black, C.M. & Abraham, D.J. (2001). The control of *ccn2* (*ctgf*) gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology*, 54, 180–183.
- Leask, A. & Abraham, D.J. (2004). TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal*, 18, 816–827.
- Lee, S.E., Kim, J.M., Jeong, S.K., Jeon, J.E., Yoon, H.J., Jeong, M.K. & Lee, S.H. (2010). Protease-activated receptor-2 mediates the expression of inflammatory cytokines, antimicrobial peptides, and matrix metalloproteinases in keratinocytes in response to *Propionibacterium acnes*. *Archives of Dermatological Research*, 302, 745–756.
- Lee, J.H., Cho, D.H. & Park, H.J. (2015). IL-18 and cutaneous inflammatory diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 29357–29369.
- Lee, Y.B., Byun, E.J. & Kim, H.S. (2019). Potential Role of the Microbiome in Acne: A Comprehensive Review. *Journal of Clinical Medicine*, 8, 987.

- Lee, C.M., Watson, R.E.B. & Kleyn, C.E. (2020). The impact of perceived stress on skin ageing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 34, 54–58.
- Lehmann, H.S., Heaton, T., Mallon, D. & Holt, P.G. (2004). Staphylococcal enterotoxin-B-mediated stimulation of interleukin-13 production as a potential aetiologic factor in eczema in infants. *International Archives of Allergy and Immunology*, 135, 306–312.
- Leiro, J.M., Castro, R., Arranz, J.A. & Lamas, J. (2007). Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International Immunopharmacology*, 7, 879–888.
- Lekshmi, V. & Muraleedhara Kurup, G. (2019). Anticoagulant activities of sulfated polysaccharides from the edible marine algae *Padina tetraströmatica* and *Ulva fasciata*: A combined *in vitro* and *in vivo* approach. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8, 693–698.
- Leliaert, F., Smith, D.R., Moreau, H., Herron, M.D., Verbruggen, H., Delwiche, C.F. & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31, 1–46.
- Lesouhaitier, O., Clamens, T., Rosay, T., Desriac, F., Louis, M., Rodrigues, S., Gannesen, A. V., Plakunov, V.K., Bouffartigues, E., Tahrioui, A., Bazire, A., Dufour, A., Cornelis, P., Chevalier, S. & Feuilloley, M.G.J. (2019). Host Peptidic Hormones Affecting Bacterial Biofilm Formation and Virulence. *Journal of Innate Immunity*, 11, 227–241.
- Li, H., Xu, L., Wang, J., Wen, Y., Vuong, C., Otto, M. & Gao, Q. (2005). Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 73, 3188–3191.
- Li, M., Villaruz, A.E., Vadyvaloo, V., Sturdevant, D.E. & Otto, M. (2008). AI-2-dependent gene regulation in *Staphylococcus epidermidis*. *BMC Microbiology*, 8, 4.
- Li, J., Chi, Z., Yu, L., Jiang, F. & Liu, C. (2017). Sulfated modification, characterization, and antioxidant and moisture absorption/retention activities of a soluble neutral polysaccharide from *Enteromorpha prolifera*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1544–1553.
- Li, W., Jiang, N., Li, B., Wan, M., Chang, X., Liu, H., Zhang, L., Yin, S., Qi, H. & Liu, S. (2018). Antioxidant activity of purified ulvan in hyperlipidemic mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 971–975.
- Li, Z., Yu, C.-H., Lin, Y.-T., Su, H.-L., Kan, K.-W., Liu, F.-C., Chen, C.-T., Lin, Y.-T., Hsu, H.-F., Lin, Y.-H., *et al.* (2019). The Potential Application of Spring *Sargassum glaucescens* Extracts in the Moisture-Retention of Keratinocytes and Dermal Fibroblast Regeneration after UVA-Irradiation. *Cosmetics*, 6, 17.
- Li, Q., Hu, F., Zhu, B., Ni, F. & Yao, Z. (2020). Insights into ulvan lyase: review of source, biochemical characteristics, structure and catalytic mechanism. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40, 432–441.
- Li, Z. (2020). Modern Mild Skin Cleansing. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 10, 85–98.
- Lin, H.C., Lin, T.H., Wu, M.Y., Chiu, Y.C., Tang, C.H., Hour, M.J., Liou, H.C., Tu, H.J., Yang, R. Sen. & Fu, W.M. (2014). 5-lipoxygenase inhibitors attenuate TNF- $\alpha$ -Induced inflammation in human synovial fibroblasts. *PLoS ONE*, 9, e107890.

- Lindahl, G.E., Papakrivopoulou, E., Dawson, S.J., Jacobsen, M.C., Bishop, J.E. & Laurent, G.J. (2002). Activation of Fibroblast Procollagen 1(I) Transcription by Mechanical Strain Is Transforming Growth Factor-dependent and Involves Increased Binding of CCAAT-binding Factor (CBF/NF-Y) at the Proximal Promoter. *Article in Journal of Biological Chemistry*, 277, 6153–6161.
- Liu, P.F., Nakatsuji, T., Zhu, W., Gallo, R.L. & Huang, C.M. (2011). Passive immunoprotection targeting a secreted CAMP factor of *Propionibacterium acnes* as a novel immunotherapeutic for acne vulgaris. *Vaccine*, 29, 3230–3238.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, 1–9.
- Liu, Q., Mazhar, M. & Miller, L.S. (2018). Immune and Inflammatory Responses to *Staphylococcus aureus* Skin Infections. *Current Dermatology Reports*, 7, 338–349.
- Llano Astuy, T., Macías Sánchez, C., Trancho Bedoya, A., Robles Chomon, J., Arroyo Hailuoto, N.L. & Coz Fernández, A. (2020). Acid depolymerization of cell wall polysaccharides from Ulvan-rich extracts of green seaweeds. *II International Congress on Biorefineries and Renewable Energies*. Santander, Colombia. February 17-20, 2020.
- Lloyd, D.H., Viac, J., Werling, D., Rème, C.A. & Gatto, H. (2007). Role of sugars in surface microbe-host interactions and immune reaction modulation. *Veterinary Dermatology*, 18, 197–204.
- Lo, T.C.T., Chang, C.A., Chiu, K.H., Tsay, P.K. & Jen, J.F. (2011). Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods. *Carbohydrate Polymers*, 86, 320–327.
- Lomholt, H.B. & Kilian, M. (2010). Population Genetic Analysis of *Propionibacterium acnes* Identifies a Subpopulation and Epidemic Clones Associated with Acne. *PLoS ONE*, 5, e12277.
- Lomholt, H.B., Scholz, C.F.P., Brüggemann, H., Tettelin, H. & Kilian, M. (2017). A comparative study of *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes* clones from acne patients and healthy controls. *Anaerobe*, 47, 57–63.
- Lopes, G., Sousa, C., Valentão, P. & Andrade, P.B. (2013). Sterols in Algae and Health. Hernández-Ledesma, B. & Herrero, M. (eds). *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 173–191.
- Lopes, N., Ray, S., Espada, S.F., Bomfim, W.A., Ray, B., Faccin-Galhardi, L.C., Linhares, R.E.C. & Nozawa, C. (2017a). Green seaweed *Enteromorpha compressa* (Chlorophyta, Ulvaceae) derived sulphated polysaccharides inhibit herpes simplex virus. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 605–612.
- Lopes, E.G., Moreira, D.A., Gullón, P., Gullón, B., Cardelle-Cobas, A. & Tavora, F.K. (2017b). Topical application of probiotics in skin: adhesion, antimicrobial and antibiofilm *in vitro* assays. *Journal of Applied Microbiology*, 122, 450–461.
- Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Pereira, A.G., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Prieto, M.A. & Simal-Gandara, J. (2020). Metabolites from Macroalgae and Its Applications in the Cosmetic Industry: A Circular Economy Approach. *Resources*, 9, 101.
- Lovell, C.R., Smolenski, K.A., Duance, V.C., Light, N.D., Young, S. & Dyson, M. (1987). Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. *British Journal of Dermatology*, 117, 419–428.
- Lu, W., Zhao, X., Xu, Z., Dong, N., Zou, S., Shen, X. & Huang, J. (2013). Development of a new colorimetric assay for lipoxigenase activity. *Analytical Biochemistry*, 441, 162–168.

- Ma, H.M., Liu, W., Zhang, P. & Yuan, X.Y. (2012). Human skin fibroblast telomeres are shortened after ultraviolet irradiation. *Journal of International Medical Research*, 40, 1871–1877.
- MacArtain, P., Gill, C.I.R., Brooks, M., Campbell, R. & Rowland, I.R. (2008). Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutrition Reviews*, 65, 535–543.
- Makkar, F. & Chakraborty, K. (2017). Antidiabetic and anti-inflammatory potential of sulphated polygalactans from red seaweeds *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria opuntia*. *International Journal of Food Properties*, 20, 1326–1337.
- Maneesh, A. & Chakraborty, K. (2018). Pharmacological potential of sulfated polygalactopyranosyl-fucopyranan from the brown seaweed *Sargassum wightii*. *Journal of Applied Phycology*, 30, 1971–1988.
- Mao, W., Zang, X., Li, Y. & Zhang, H. (2006). Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. *Journal of Applied Phycology*, 18, 9–14.
- Maquart, F.X. & Monboisse, J.C. (2014). Extracellular matrix and wound healing. *Pathologie Biologie*, 62, 91–95.
- Marionnet, C., Pierrard, C., Vioux-Chagnoleau, C., Sok, J., Asselineau, D. & Bernerd, F. (2006). Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 971–979.
- Marks, J.G. & Miller, J.J. (2017). Structure and Function of the Skin. *Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology*, 6th edn. Elsevier, 2–10.
- Mashima, R. & Okuyama, T. (2015). The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. *Redox Biology*, 6, 297–310.
- Massagué, J. (2012). TGF- $\beta$  signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 616–630.
- Matejuk, A. (2018). Skin Immunity. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 66, 45–54.
- Matloub, A.A., Aglan, H.A., Mohamed El Souda, S.S., Aboutabl, M.E., Maghraby, A.S. & Ahmed, H.H. (2016). Influence of bioactive sulfated polysaccharide-protein complexes on hepatocarcinogenesis, angiogenesis and immunomodulatory activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9, 1200–1211.
- Matloub, A.A., Salama, A.H., Aglan, H.A., AbouSamra, M.M., ElSouda, S.S.M. & Ahmed, H.H. (2018). Exploiting bilosomes for delivering bioactive polysaccharide isolated from *Enteromorpha intestinalis* for hacking hepatocellular carcinoma. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44, 523–534.
- Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T., Chihara, M., Yamamoto, Y., Niki, E. & Karube, I. (1997). A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 9, 29–35.
- Mauviel, A., Chung, K.Y., Agarwal, A., Tamait, K. & Uitto, J. (1996). Cell-specific induction of distinct oncogenes of the jun family is responsible for differential regulation of collagenase gene expression by transforming growth factor- $\beta$  in fibroblasts and keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 10917–10923.
- Mcdowell, A., Barnard, E., Nagy, I., Gao, A. & Tomida, S. (2012). An Expanded Multilocus Sequence Typing Scheme for *Propionibacterium acnes*: Investigation of “Pathogenic”, “Commensal” and Antibiotic Resistant Strains. *PLoS ONE*, 7, 41480.

- McDowell, A., Valanne, S., Ramage, G., Tunney, M.M., Glenn, J. V., McLorinan, G.C., Bhatia, A., Maisonneuve, J.F., Lodes, M., Persing, D.H. & Patrick, S. (2005). *Propionibacterium acnes* types I and II represent phylogenetically distinct groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 326–334.
- Meigel, W.N., Gay, S. & Weber, L. (1977). Dermal architecture and collagen type distribution. *Archives for Dermatological Research*, 259, 1–10.
- Mekni, M.A., Bouchami, O., Achour, W. & Ben Hassen, A. (2012). Strong biofilm production but not adhesion virulence factors can discriminate between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains. *APMIS*, 120, 605–611.
- Merkel, J.R., Dipaolo, B.R., Hallock, G.G. & Rice, D.C. (1988). Type I and Type III Collagen Content of Healing Wounds in Fetal and Adult Rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 187, 493–497.
- Mian, A.J. & Percival, E. (1973). Carbohydrates of the brown seaweeds *Himantalia lorea*, *Bifurcaria bifurcata*, and *Padina pavonia*: Part I. extraction and fractionation. *Carbohydrate Research*, 26, 133–146.
- Michalak, I. & Chojnacka, K. (2014). Algal extracts: Technology and advances. *Engineering in Life Sciences*, 14, 581–591.
- Michalak, I., Dmytryk, A. & Chojnacka, K. (2020). Algae Cosmetics. Kim, S. (ed). *Encyclopedia of Marine Biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd, 65–85.
- Migdal, C. & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant. *Médecine/Sciences*, 27, 405–412.
- Mijouin, L., Hillion, M., Ramdani, Y., Jaouen, T., Duclairioir-Poc, C., Follet-Gueye, M.-L., Lati, E., Yvergnaux, F., Driouch, A., Lefeuvre, L., Farmer, C., Misery, L. & Feuilleley, M.G.J. (2013). Effects of a Skin Neuropeptide (Substance P) on Cutaneous Microflora. *PLoS ONE*, 8, e78773.
- Mo’o, F.R.C., Wilar, G., Devkota, H.P. & Wathoni, N. (2020). Ulvan, a polysaccharide from Macroalga *Ulva* sp.: A review of chemistry, biological activities and potential for food and biomedical applications. *Applied Sciences*, 10, 5488.
- Mogul, R. & Holman, T.R. (2001). Inhibition studies of soybean and human 15-lipoxygenases with long-chain alkenyl sulfate substrates. *Biochemistry*, 40, 4391–4397.
- Mohsin, S. & Muraleedhara Kurup, G. (2011). Mechanism underlying the anti-inflammatory effect of sulphated polysaccharide from *Padina tetrastratica* against carrageenan induced paw edema in rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 1, 294–301.
- Mondal, R. & Ohnishi, K. (2020). Characterization of *Glaciecola* sp. enzymes involved in the late steps of degradation of sulfated polysaccharide ulvan extracted from *Ulva ohnoi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 523, 441–445.
- Moon, H.J., Lee, S.R., Shim, S.N., Jeong, S.H., Stonik, V.A., Rasskazov, V.A., Zvyagintseva, T. & Lee, Y.H. (2008). Fucoidan Inhibits UVB-Induced MMP-1 Expression in Human Skin Fibroblasts. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31, 284–289.
- Moon, H.J., Lee, S.H., Ku, M.J., Yu, B.C., Jeon, M.J., Jeong, S.H., Stonil, V.A., Zvyagintseva, T.N., Ermakova, S.P. & Lee, Y.H. (2009). Fucoidan inhibits UVB-induced MMP-I promoter expression and down regulation of type I procollagen synthesis in human skin fibroblasts. *European Journal of Dermatology*, 19, 129–134.



- Morán-Santibañez, K., Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Robledo, D., Freile-Pelegrián, Y., Peña-Hernández, M.A., Rodríguez-Padilla, C. & Trejo-Avila, L.M. (2016). Synergistic Effects of Sulfated Polysaccharides from Mexican Seaweeds against Measles Virus. *BioMed Research International*, 2016, 1–11.
- Mori, K., Hatamochi, A., Ueki, H., Olsen, A. & Jimenez, S.A. (1996). The transcription of human  $\alpha 1(I)$  procollagen gene (*COL1A1*) is suppressed by tumour necrosis factor- $\alpha$  through proximal short promoter elements: Evidence for suppression mechanisms mediated by two nuclear-factor-binding sites. *Biochemical Journal*, 319, 811–816.
- Mori, Y., Chen, S.J. & Varga, J. (2003). Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis and Rheumatism*, 48, 1964–1978.
- Morvan, P.-Y. & Vallee, R. (2018). Evaluation of the Effects of Stressful Life on Human Skin Microbiota. *Applied Microbiology*, 4, 1000140.
- Mueller, S.N., Zaid, A. & Carbone, F.R. (2014). Tissue-resident T cells: Dynamic players in skin immunity. *Frontiers in Immunology*, 5, 332.
- Muhamad, I.I., Zulkifli, N., Selvakumaran, S. a/p. & Lazim, N.A.M. (2019). Bioactive Algal-Derived Polysaccharides: Multi-Functionalization, Therapeutic Potential and Biomedical Applications. *Current Pharmaceutical Design*, 25, 1147–1162.
- Mukherjee, S., Mitra, R., Maitra, A., Gupta, S., Kumaran, S., Chakraborty, A. & Majumder, P.P. (2016). Sebum and Hydration Levels in Specific Regions of Human Face Significantly Predict the Nature and Diversity of Facial Skin Microbiome. *Scientific Reports*, 6, 36062.
- Mulloy, B. & Hogwood, J. (2015). Chromatographic molecular weight measurements for heparin, its fragments and fractions, and other glycosaminoglycans. *Methods in Molecular Biology*, 1229, 105–118.
- Myllyharju, J. & Kivirikko, K.I. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends in Genetics*, 20, 33–43.
- N'Diaye, A., Mijouin, L., Hillion, M., Diaz, S., Konto-Ghiorgi, Y., Percoco, G., Chevalier, S., Lefevre, L., Harmer, N.J., Lesouhaitier, O. & Feuilloley, M.G.J. (2016). Effect of Substance P in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* virulence: Implication for skin homeostasis. *Frontiers in Microbiology*, 7, 506.
- N'Diaye, A., Gannesen, A.V., Borrel, V., Maillot, O., Enault, J., Racine, P.J., Plakunov, V., Chevalier, S., Lesouhaitier, O. & Feuilloley, M.G.J. (2017). Substance P and calcitonin gene-related peptide: Key regulators of cutaneous microbiota homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 15.
- Na, S.Y., Roh, J.Y., Kim, J.M., Tamang, M.D. & Lee, J.R. (2012). Analysis of colonization and genotyping of the exotoxins of *Staphylococcus aureus* in patients with atopic dermatitis. *Annals of Dermatology*, 24, 413–419.
- Nada, H.A., Gomaa, N.I.M., Elakhras, A., Wasfy, R. & Baker, R.A. (2012). Skin colonization by superantigen-producing *Staphylococcus aureus* in Egyptian patients with atopic dermatitis and its relation to disease severity and serum interleukin-4 level. *International Journal of Infectious Diseases*, 16, e29-33.
- Nagy, I., Pivarcsi, A., Koreck, A., Széll, M., Urbán, E. & Kemény, L. (2005). Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human  $\beta$ -defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *Journal of Investigative Dermatology*, 124, 931–938.

- Nagy, I., Pivarcsi, A., Kis, K., Koreck, A., Bodai, L., McDowell, A., Seltmann, H., Patrick, S., Zouboulis, C.C. & Kemény, L. (2006). *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes and Infection*, 8, 2195–2205.
- Nakamura, Y., Oscherwitz, J., Cease, K.B., Chan, S.M., Muñoz-Planillo, R., Hasegawa, M., Villaruz, A.E., Cheung, G.Y.C., McGavin, M.J., Travers, J.B., Otto, M., Inohara, N. & Núñez, G. (2013). Staphylococcus  $\delta$ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature*, 503, 397–401.
- Nakatsuji, T., Tang, D.C., Zhang, L., Gallo, R.L. & Huang, C.M. (2011). *Propionibacterium acnes* CAMP factor and host acid sphingomyelinase contribute to bacterial virulence: Potential targets for inflammatory acne treatment. *PLoS ONE*, 6, e14797.
- Nakatsuji, T. & Gallo, R.L. (2012). Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas. *Journal of Investigative Dermatology*, 132, 887–895.
- Nakatsuji, T., Chiang, H.-I., Jiang, S.B., Nagarajan, H., Zengler, K. & Gallo, R.L. (2013). The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin. *Nature Communications*, 4, 1431.
- Nayar, S. & Bott, K. (2014). Current Status of Global Cultivated Seaweed Production and Markets. *World Aquaculture*, 32–37.
- Naylor, E.C., Watson, R.E.B. & Sherratt, M.J. (2011). Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*, 69, 249–256.
- Nazipi, S., Stødkilde, K., Scavenius, C. & Brüggemann, H. (2017). The Skin Bacterium *Propionibacterium acnes* Employs Two Variants of Hyaluronate Lyase with Distinct Properties. *Microorganisms*, 5, 57.
- Ngo, M.A., Sinitsyna, N.N., Qin, Q. & Rice, R.H. (2007). Oxygen-dependent differentiation of human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 354–361.
- Nguyen, C.T., Sah, S.K. & Kim, T.Y. (2018). Inhibitory effects of superoxide dismutase 3 on *Propionibacterium acnes*-induced skin inflammation. *Scientific Reports*, 8, 1–12.
- Nguyen, A.T. & Kim, K.Y. (2020). Inhibition of Proinflammatory Cytokines in *Cutibacterium acnes*-Induced Inflammation in HaCaT Cells by Using *Buddleja davidii* Aqueous Extract. *International Journal of Inflammation*, 2020, 8063289.
- Nicolaides, N. (1965). Skin lipids. IV. Biochemistry and function. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 42, 708–712.
- Nishijima, S., Kurokawa, I., Katoh, N. & Watanabe, K. (2000). The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne lesions. *Journal of Dermatology*, 27, 318–323.
- Niyonsaba, F., Nagaoka, I. & Ogawa, H. (2006). Human defensins and cathelicidins in the skin: Beyond direct antimicrobial properties. *Critical Reviews in Immunology*, 26, 545–576.
- Nodake, Y., Matsumoto, S., Miura, R., Honda, H., Ishibashi, G., Matsumoto, S., Dekio, I. & Sakakibara, R. (2015). Pilot study on novel skin care method by augmentation with *Staphylococcus epidermidis*, an autologous skin microbe – A blinded randomized clinical trial. *Journal of Dermatological Science*, 79, 119–126.
- Norris, D.A. (2011). Structure and Function of the Skin. Goldman, L. & Schafer, A.I. (eds). *Goldman's Cecil Medicine*, 24th edn. Elsevier Inc., 2498–2503.



- O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D.A., Loughman, A., Foster, T.J. & O'Gara, J.P. (2008). A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *Journal of Bacteriology*, 190, 3835–3850.
- O'Neill, A.M. & Gallo, R.L. (2018). Host-microbiome interactions and recent progress into understanding the biology of acne vulgaris. *Microbiome*, 6, 177.
- Oak, A.S.W., Athar, M., Yusuf, N. & Elmetts, C.A. (2017). UV and skin: Photocarcinogenesis. Krutmann, J. & Merk, H.F. (eds). *Environment and Skin*. Springer, 67–103.
- Oh, J., Byrd, A.L., Deming, C., Conlan, S., NISC Comparative Sequencing Program, N.C.S., Kong, H.H. & Segre, J.A. (2014). Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature*, 514, 59–64.
- Olczyk, P., Mencner, Ł. & Komosinska-Vassev, K. (2014). The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *BioMed Research International*, 2014, 747584.
- Omoigui, S. (2007). The Interleukin-6 inflammation pathway from cholesterol to aging - Role of statins, bisphosphonates and plant polyphenols in aging and age-related diseases. *Immunity and Ageing*, 4, 1.
- Onoue, S., Kobayashi, T., Takemoto, Y., Sasaki, I. & Shinkai, H. (2003). Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. *Journal of Dermatological Science*, 33, 105–111.
- Ottaviani, M., Alestas, T., Flori, E., Mastrofrancesco, A., Zouboulis, C.C. & Picardo, M. (2006). Peroxidated squalene induces the production of inflammatory mediators in HaCaT keratinocytes: A possible role in acne vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 2430–2437.
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nature reviews Microbiology*, 7, 555–567.
- Otto, M. (2010). Staphylococcus colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert Review of Dermatology*, 5, 183–195.
- Otto, M. (2014). Phenol-soluble modulins. *International Journal of Medical Microbiology*, 304, 164–169.
- Oyewole, A.O. & Birch-Machin, M.A. (2015). Sebum, inflammasomes and the skin: Current concepts and future perspective. *Experimental Dermatology*, 24, 651–654.
- Ozanne, H., Toumi, H., Roubinet, B., Landemarre, L., Lespessailles, E., Daniellou, R. & Cesaro, A. (2020). Laminarin effects, a  $\beta$ -(1,3)-glucan, on skin cell inflammation and oxidation. *Cosmetics*, 7, 66.
- Pade, N., Linka, N., Ruth, W., Weber, A.P.M. & Hagemann, M. (2015). Floridoside and isofloridoside are synthesized by trehalose 6-phosphate synthase-like enzymes in the red alga *Galdieria sulphuraria*. *New Phytologist*, 205, 1227–1238.
- Pageon, H., Azouaoui, A., Zucchi, H., Ricois, S., Tran, C. & Asselineau, D. (2019). Potentially beneficial effects of rhamnose on skin ageing: an *in vitro* and *in vivo* study. *International Journal of Cosmetic Science*, 41, 213–220.
- Palanisamy, S., Vinosha, M., Rajasekar, P., Anjali, R., Sathiyaraj, G., Marudhupandi, T., Selvam, S., Prabhu, N.M. & You, S.G. (2019). Antibacterial efficacy of a fucoidan fraction (Fu-F2) extracted from *Sargassum polycystum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 485–495.

- Palumbo-Zerr, K., Zerr, P., Distler, A., Fliehr, J., Mancuso, R., Huang, J., Mielenz, D., Tomcik, M., Fűrnrrohr, B.G., Scholtysek, C., *et al.* (2015). Orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transforming growth factor- $\beta$  2 signaling and fibrosis. *Nature Medicine*, 21, 150–158.
- Pankiewicz, R., Łęska, B., Messyasz, B., Fabrowska, J., Sołoducho, M. & Pikosz, M. (2016). First isolation of polysaccharidic ulvans from the cell walls of freshwater algae. *Algal Research*, 19, 348–354.
- Paradossi, G., Cavalieri, F., Pizzoferrato, L. & Liquori, A.M. (1999). A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 25, 309–315.
- Park, J.H., Kim, S.R., An, H.J., Kim, W.J., Choe, M. & Han, J.A. (2012). Esculetin promotes type I procollagen expression in human dermal fibroblasts through MAPK and PI3K/Akt pathways. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 368, 61–67.
- Park, M. & Hong, J. (2016). Roles of NF- $\kappa$ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*, 5, 15.
- Park, R.M., Ahn, J.Y., Kim, S.Y., Wee, J.H., Kim, Y.H. & Min, J. (2019). Effect of Alginate Oligosaccharides on Collagen Expression in HS 27 Human Dermal Fibroblasts. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 11, 327–334.
- Parlement Européen et du Conseil. (2009). Règlement (CE) No 1223/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques.
- Patti, J.M., Jonssonq, H., Gussq, B., Switalskill, L.M., Wibergq, K., Lindbergq, M. & Hiiiikll, M. (1992). Molecular Characterization and Expression of a Gene Encoding a *Staphylococcus aureus* Collagen Adhesin. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 4766–4772.
- Paugam, C., Corvec, S., Saint-Jean, M., Le Moigne, M., Khammari, A., Boisrobert, A., Nguyen, J.M., Gaultier, A. & Dréno, B. (2017). *Propionibacterium acnes* phylotypes and acne severity: an observational prospective study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31, e398–e399.
- Peasura, N., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O. & Wanlapa, S. (2015). Characteristics and antioxidant of *Ulva intestinalis* sulphated polysaccharides extracted with different solvents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 912–919.
- Peasura, N., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., Vongsawasdi, P. & Chao, L.K. (2016). Assessment of biochemical and immunomodulatory activity of sulphated polysaccharides from *Ulva intestinalis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 269–277.
- Peng, W. & Novak, N. (2015). Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 45, 566–574.
- Pengzhan, Y., Ning, L., Xiguang, L., Gefei, Z., Quanbin, Z. & Pengcheng, L. (2003). Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacological Research*, 48, 543–549.
- Pengzhan, Y., Quanbin, Z., Hong, Z., Xizhen, N. & Zhien, L. (2004). Preparation of polysaccharides in different molecular weights from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 22, 381–385.
- Peñuela, A., Robledo, D., Bourgougnon, N., Bedoux, G., Hern, E. & Freile-Pelegriñ, Y. (2018). Environmentally Friendly Valorization of *Solieria filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) from IMTA Using a Biorefinery Concept. *Marine Drugs*, 16, 487.

- Percival, E. & McDowell, R.H. (1968). Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. 219 p.
- Percival, E. (1979). The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. *British Phycological Journal*, 14, 103–117.
- Percival, S.L., Emanuel, C., Cutting, K.F. & Williams, D.W. (2012). Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *International Wound Journal*, 9, 14–32.
- Percoco, G., Merle, C., Jaouen, T., Ramdani, Y., Bénard, M., Hillion, M., Mijouin, L., Lati, E., Feuilleley, M.G.J., Lefeuvre, L., Driouich, A. & Follet-Gueye, M.-L. (2013). Antimicrobial peptides and pro-inflammatory cytokines are differentially regulated across epidermal layers following bacterial stimuli. *Experimental Dermatology*, 22, 800–806.
- Percoco, G. (2018). Methods and results in 3D skin biopsies. *The Microbiome of the skin - New avenues of research, In cosmetics*. Amsterdam. April 17, 2018.
- Pereira, L. (2018). Seaweeds as Source of Bioactive Substances and Skin Care Therapy—Cosmeceuticals, Algoteraphy, and Thalassotherapy. *Cosmetics*, 5, 68.
- Pereira, L. (2021). Macroalgae. *Encyclopedia*, 1, 177–188.
- Philips, N., Auler, S., Hugo, R. & Gonzalez, S. (2011). Beneficial Regulation of Matrix Metalloproteinases for Skin Health. *Enzyme Research*, 2011, 427285.
- Piek, E., Heldin, C.-H. & Dijke, P. Ten. (1999). Specificity, diversity, and regulation in TGF- $\beta$  superfamily signaling. *The FASEB Journal*, 13, 2105–2124.
- Pierre, G. (2010). Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion. Thèse de l'Université de La Rochelle - Spécialité Biochimie. Soutenue le 6 décembre 2010 à La Rochelle.
- Pillai, S., Oresajo, C. & Hayward, J. (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: Roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - A review. *International Journal of Cosmetic Science*, 27, 17–34.
- Pimentel, F., Alves, R., Rodrigues, F. & P. P. Oliveira, M. (2017). Macroalgae-Derived Ingredients for Cosmetic Industry—An Update. *Cosmetics*, 5, 2.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D. & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763.
- Pliego-Cortés, H., Wijesekara, I., Lang, M., Bourgougnon, N. & Bedoux, G. (2020). Current knowledge and challenges in extraction, characterization and bioactivity of seaweed protein and seaweed-derived proteins. Bourgougnon, N. & Jacquot, J.-P. (eds). *Seaweeds Around the World: State of Art and Perspectives*, Elsevier. Academic Press, 290–312.
- Popper, Z.A., Michel, G., Hervé, C., Domozych, D.S., Willats, W.G.T., Tuohy, M.G., Kloareg, B. & Stengel, D.B. (2011). Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 567–590.
- Potter, A., Ghibaudo, M. & Domanov, Y. (2015). Cosmetic use of a polysaccharide sulfate. Patent FR3021535A1.
- Powell, J. (2006). Skin physiology. *Women's Health Medicine*, 3, 130–133.

- Prabhu, M., Golberg, A., Gozin, M., Kazir, M., Chemodanov, A., Gottlieb, R., Nahor, O., Israel, A. & Livney, Y.D. (2019). Starch from the sea: The green macroalga *Ulva ohnoi* as a potential source for sustainable starch production in the marine biorefinery. *Algal Research*, 37, 215–227.
- Pratoomthai, B., Gangnonngiw, W., Songtavisin, T. & Wongprasert, K. (2020). Effect of sulfated galactans from red seaweed *Gracilaria fisheri* on extracellular matrix production in human dermal fibroblast. *The FASEB Journal*, 34, S1.
- Probst, A.J., Auerbach, A.K. & Moissl-Eichinger, C. (2013). Archaea on Human Skin. *PLoS ONE*, 8, e65388.
- Promega, C. (2016). CytoTox 96 ® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay.
- Prost-Squarcioni, C., Fraitag, S., Heller, M. & Boehm, N. (2008). Functional histology of dermis. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 135, 5–20.
- Purohit, T., He, T., Qin, Z., Li, T., Fisher, G.J., Yan, Y., Voorhees, J.J. & Quan, T. (2016). Smad3-dependent regulation of type I collagen in human dermal fibroblasts: Impact on human skin connective tissue aging. *Journal of Dermatological Science*, 83, 80–83.
- Qi, H., Zhao, T., Zhang, Q., Li, Z., Zhao, Z. & Xing, R. (2005a). Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 17, 527–534.
- Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Chen, R., Zhang, H., Niu, X. & Li, Z. (2005b). Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 37, 195–199.
- Qi, H., Huang, L., Liu, X., Liu, D., Zhang, Q. & Liu, S. (2012). Antihyperlipidemic activity of high sulfate content derivative of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Carbohydrate Polymers*, 87, 1637–1640.
- Qi, X., Mao, W., Chen, Y., Chen, Y., Zhao, C., Li, N. & Wang, C. (2013). Chemical characteristics and anticoagulant activities of two sulfated polysaccharides from *Enteromorpha linza* (Chlorophyta). *Journal of Ocean University of China*, 12, 175–182.
- Qi, H. & Sheng, J. (2015). The Antihyperlipidemic Mechanism of High Sulfate Content Ulvan in Rats. *Marine Drugs*, 13, 3407–3421.
- Quan, T., Qin, Z., Robichaud, P., Voorhees, J.J. & Fisher, G.J. (2011). CCN1 contributes to skin connective tissue aging by inducing Age-Associated Secretory Phenotype in human skin dermal fibroblasts. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 5, 201–207.
- Quemener, B., Lahaye, M. & Bobin-Dubigeon, C. (1997). Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. *Journal of Applied Phycology*, 9, 179–188.
- Racine, P., Janvier, X., Clabaut, M., Catovic, C., Souak, D., Boukerb, A.M., Groboillot, A., Kontoghiorghi, Y., Duclair-Poc, C., Lesouhaitier, O., Orange, N., Chevalier, S. & Feuilloley, M.G.J. (2020). Dialog between skin and its microbiota: Emergence of “Cutaneous Bacterial Endocrinology.” *Experimental Dermatology*, 29, 790–800.
- Rahimi, F., Tabarsa, M. & Rezaei, M. (2016). Ulvan from green algae *Ulva intestinalis*: optimization of ultrasound-assisted extraction and antioxidant activity. *Journal of Applied Phycology*, 28, 2979–2990.
- Rangaraj, A.G. & Harding, K.G. (2011). Role of collagen in wound management. *Wounds*, 7, 54–63.

- Ravelojaona, V., Robert, A.-M., Robert, L. & Renard, G. (2008). Collagen biosynthesis in cell culture: Comparison of corneal keratocytes and skin fibroblasts: Effect of rhamnase-rich oligo- and polysaccharides. *Pathologie Biologie*, 56, 66–69.
- Ray, B. & Lahaye, M. (1995). Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Chemical structure of ulvan. *Carbohydrate Research*, 274, 313–318.
- Ray, B. (2006). Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: Isolation, purification and structural features. *Carbohydrate Polymers*, 66, 408–416.
- Redini, F., Tixier, J.-M., Petitou, M., Choay, J., Robert, L. & Hornebeck, W. (1988). Inhibition of leucocyte elastase by heparin and its derivatives. *Biochemical Journal*, 252, 515–519.
- Redoules, D., Daunes-Marion, S. & Aries, M.-F. (2010). Polyunsaturated fatty acid and diol ester as an anti-acne agent. Patent WO2010072738A1.
- Reunanen, N., Li, S.P., Ahonen, M., Foschi, M., Han, J. & Kähäri, V.M. (2002). Activation of p38 $\alpha$  MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 32360–32368.
- Rindi, F., Soler-Vila, A. & Guiry, M.D. (2012). Taxonomy of marine macroalgae used as sources of bioactive compounds. Hayes, M. (ed). *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*. Springer, 1–53.
- Rioux, L.-E., Moulin, V., Beaulieu, M. & Turgeon, S.L. (2013). Human skin fibroblast response is differentially regulated by galactofucan and low molecular weight galactofucan. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 1, 105–110.
- Rioux, L.-E. & Turgeon, S.L. (2015). Seaweed carbohydrates. Tiwari, B.K. & Troy, D. (eds). *Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications*. Academic Press, 141–192.
- Rippe, R.A., Schrum, L.W., Stefanovic, B., Solís-Herruzo, J.A. & Brenner, D.A. (1999). NF- $\kappa$ B inhibits expression of the  $\alpha$ 1(I) collagen gene. *DNA and Cell Biology*, 18, 751–761.
- Rivero-Gutiérrez, B., Anzola, A., Martínez-Augustin, O. & De Medina, F.S. (2014). Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Analytical Biochemistry*, 467, 1–3.
- Robic, A., Sassi, J.-F. & Lahaye, M. (2008). Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (Chlorophyta) on the extraction yield, the physico-chemical and rheological properties of ulvan. *Carbohydrate Polymers*, 74, 344–352.
- Robic, A., Sassi, J.F., Dion, P., Lerat, Y. & Lahaye, M. (2009a). Seasonal variability of physicochemical and rheological properties of ulvan in two *Ulva* species (Chlorophyta) from the Brittany coast. *Journal of Phycology*, 45, 962–973.
- Robic, A., Bertrand, D., Sassi, J.-F., Lerat, Y. & Lahaye, M. (2009b). Determination of the chemical composition of ulvan, a cell wall polysaccharide from *Ulva* spp. (Ulvales, Chlorophyta) by FT-IR and chemometrics. *Journal of Applied Phycology*, 21, 451–456.
- Robic, A., Rondeau-Mouro, C., Sassi, J.F., Lerat, Y. & Lahaye, M. (2009c). Structure and interactions of ulvan in the cell wall of the marine green algae *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyceae). *Carbohydrate Polymers*, 77, 206–216.
- Robic, A., Gaillard, C., Sassi, J.-F., Lerat, Y. & Lahaye, M. (2009d). Ultrastructure of ulvan: A polysaccharide from green seaweeds. *Biopolymers*, 91, 652–664.



- Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K.-M., Heilmann, C., Herrmann, M. & Mack, D. (2005). Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Molecular Microbiology*, 55, 1883–1895.
- Rong, Y.H., Zhang, G.A., Wang, C. & Ning, F.G. (2008). Quantification of type I and III collagen content in normal human skin in different age groups. *Chinese Journal of Burns*, 24, 51–53.
- Rosert, J. & de Crombrughe, B. (2002). Type I Collagen: Structure, Synthesis and Regulation. Bilezikian, J.P., Raisz, L.G. & Rodan, G.A. (eds). *Principles of Bone Biology*, Second. Elsevier, 189–210.
- Rostami, Z., Tabarsa, M., You, S.G. & Rezaei, M. (2017). Relationship between molecular weights and biological properties of alginates extracted under different methods from *Colpomenia peregrina*. *Process Biochemistry*, 58, 289–297.
- Roulot, D., Sevcsik, A.M., Coste, T., Strosberg, A.D. & Marullo, S. (1999). Role of transforming growth factor  $\beta$  type II receptor in hepatic fibrosis: Studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats. *Hepatology*, 29, 1730–1738.
- Rousselle, P., Braye, F. & Dayan, G. (2019). Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 146, 344–365.
- Rupérez, P. (2002). Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*, 79, 23–26.
- Saitta, B., Gaidarova, S., Cicchillitti, L. & Jimenez, S.A. (2000). CCAAT binding transcription factor binds and regulates human *COL1A1* promoter activity in human dermal fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism*, 43, 2219–2229.
- Sanda Chedea, V. & Jisaka, M. (2011). Inhibition of soybean lipoxygenases – Structural and activity models for the lipoxygenase isoenzymes family. Krezhova, D. (ed). *Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products*. InTechOpen, London, United Kingdom, 109–130.
- Sandorfi, N., Louneva, N., Hitraya, E., Hajnoczky, G., Saitta, B. & Jimenez, S.A. (2005). Inhibition of collagen gene expression in systemic sclerosis dermal fibroblasts by mithramycin. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64, 1685–1691.
- Sanford, J.A. & Gallo, R.L. (2013). Functions of the skin microbiota in health and disease. *Seminars in Immunology*, 25, 370–377.
- Sardari, R.R.R. & Nordberg Karlsson, E. (2018). Marine Poly- and Oligosaccharides as Prebiotics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 11544–11549.
- Sarithakumari, C.H. & Kurup, G.M. (2013). Alginate acid isolated from *Sargassum wightii* exhibits anti-inflammatory potential on type II collagen induced arthritis in experimental animals. *International Immunopharmacology*, 17, 1108–1115.
- Sarrazy, V., Billet, F., Micallef, L., Coulomb, B. & Desmoulière, A. (2011). Mechanisms of pathological scarring: Role of myofibroblasts and current developments. *Wound Repair and Regeneration*, 19, s10–s15.
- Scharnweber, D., Hübner, L., Rother, S., Hempel, U., Anderegg, U., Samsonov, S.A., Pisabarro, M.T., Hofbauer, L., Schnabelrauch, M., Franz, S., Simon, J. & Hintze, V. (2015). Glycosaminoglycan derivatives: promising candidates for the design of functional biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26, 232.
- Schauber, J. & Gallo, R.L. (2008). Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122, 261–266.

- Scholz, C.F.P. & Kilian, M. (2016). The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 4422–4432.
- Sebaaly, C., Kassem, S., Grishina, E., Kanaan, H., Sweidan, A., Said Chmit, M. & Kanaan, H.M. (2014). Anticoagulant and antibacterial activities of polysaccharides of red algae *Corallina* collected from Lebanese coast. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4, 30–037.
- Segel, G.B., Halterman, M.W. & Lichtman, M.A. (2011). The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *Journal of Leukocyte Biology*, 89, 359–372.
- Sellimi, S., Maalej, H., Rekik, D.M., Benslima, A., Ksouda, G., Hamdi, M., Sahnoun, Z., Li, S., Nasri, M. & Hajji, M. (2018). Antioxidant, antibacterial and *in vivo* wound healing properties of laminaran purified from *Cystoseira barbata* seaweed. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 633–644.
- Senni, K., Pellat, B., Gogly, B., Blondin, C., Jozefonvicz, J., Letourneur, D., Collic-Jouault, S., Durant, P. & Siquin, C. (1998). Utilisation de fucane comme régulateur de la reconstruction des tissus conjonctifs. Patent WO 99/32099.
- Senni, K., Gueniche, F., Foucault-Bertaud, A., Igondjo-Tchen, S., Fioretti, F., Collic-Jouault, S., Durand, P., Guezennec, J., Godeau, G. & Letourneur, D. (2006). Fucoidan a sulfated polysaccharide from brown algae is a potent modulator of connective tissue proteolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445, 56–64.
- Sfriso, R., Egert, M., Gempeler, M., Voegeli, R. & Campiche, R. (2019). Revealing the secret life of skin - with the microbiome you never walk alone. *International Journal of Cosmetic Science*, 42, 116–126.
- Shao, P., Chen, M., Pei, Y. & Sun, P. (2013). *In vitro* antioxidant activities of different sulfated polysaccharides from chlorophytan seaweeds *Ulva fasciata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 295–300.
- Sharma, O.P. (2011). *Algae - Series on Diversity of Microbes and Cryptograms*. 389 p. McGraw Hill.
- Shin, J.W., Kwon, S.H., Choi, J.Y., Na, J.I., Huh, C.H., Choi, H.R. & Park, K.C. (2019). Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 2126.
- Shokryazdan, P., Sieo, C.C., Kalavathy, R., Liang, J.B., Alitheen, N.B., Faseleh Jahromi, M. & Ho, Y.W. (2014). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed Research International*, 2014, 927268.
- Shoulders, M.D. & Raines, R.T. (2009). Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 929–958.
- Shu, M., Wang, Y., Yu, J., Kuo, S., Coda, A., Jiang, Y., Gallo, R.L. & Huang, C.M. (2013a). Fermentation of *Propionibacterium acnes*, a Commensal Bacterium in the Human Skin Microbiome, as Skin Probiotics against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*, 8, e55380.
- Shu, M., Kuo, S., Wang, Y., Jiang, Y., Liu, Y.-T., Gallo, R.L. & Huang, C.-M. (2013b). Porphyrin Metabolisms in Human Skin Commensal *Propionibacterium acnes* Bacteria: Potential Application to Monitor Human Radiation Risk. *Current Medicinal Chemistry*, 20, 562–568.
- Siddhanta, A.K., Goswami, A.M., Ramavat, B.K., Mody, K.H. & Mairh, O.P. (2001). Water soluble polysaccharides of marine algal species of *Ulva* (Ulvales, *Chlorophyta*) of Indian waters. *Indian Journal of Marine Sciences*, 30, 166–172.



- Sierra-Sepúlveda, A., Esquinca-González, A., Benavides-Suárez, S.A., Sordo-Lima, D.E., Caballero-Islas, A.E., Cabral-Castañeda, A.R. & Rodríguez-Reyna, T.S. (2019). Systemic sclerosis pathogenesis and emerging therapies, beyond the fibroblast. *BioMed Research International*, 2019, 4569826.
- Silbert, J.E., Palmer, M.E., Humphries, D.E. & Silbert, C.K. (1986). Formation of dermatan sulfate by cultured human skin fibroblasts. Effects of sulfate concentration on proportions of dermatan/chondroitin. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 13397–13400.
- Silhavy, T.J., Kahne, D. & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, a000414.
- Siméon, A., Wegrowski, Y., Bontemps, Y. & Maquart, F.X. (2000). Expression of glycosaminoglycans and small proteoglycans in wounds: Modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu<sup>2+</sup>. *Journal of Investigative Dermatology*, 115, 962–968.
- Singh, B., Malhotra, H., Kumar, D., Mujtaba, S.F. & Upadhyay, A.K. (2019). Understanding Cellular and Molecular Events of Skin Aging and Cancer: An Integrative Perspective. Dwivedi, A., Agarwal, N., Ray, L. & Tripathi, A.K. (eds). *Skin Aging & Cancer*. Springer, 11–28.
- Sivamani, R.K., Garcia, M.S. & Rivkah Isseroff, R. (2007). Wound re-epithelialization: Modulating keratinocyte migration in wound healing. *Frontiers in Bioscience*, 12, 2849–2868.
- Skabytska, Y. & Biedermann, T. (2016). *Staphylococcus epidermidis* Sets Things Right Again. *Journal of Investigative Dermatology*, 136, 559–560.
- Škrovánková, S. (2011). Seaweed vitamins as nutraceuticals. Kim, S.-K. (ed). *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press, 357–369.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76–85.
- Smith, M.M. & Melrose, J. (2015). Proteoglycans in Normal and Healing Skin. *Advances in Wound Care*, 4, 152–173.
- Solis-Herruzo, J.A., Brenner, D.A. & Chojkier, M. (1988). Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 5841–5845.
- Sonesson, A., Przybyszewska, K., Eriksson, S., Mörgelin, M., Kjellström, S., Davies, J., Potempa, J. & Schmidtchen, A. (2017). Identification of bacterial biofilm and the *Staphylococcus aureus* derived protease, staphopain, on the skin surface of patients with atopic dermatitis. *Scientific Reports*, 7, 8689.
- Sorrell, J.M. & Caplan, A.I. (2004). Fibroblast heterogeneity: More than skin deep. *Journal of Cell Science*, 117, 667–675.
- Soukaina, B., Zainab, E.A.T., Guillaume, P., Halima, R., Philippe, M., Cherkaoui, E.M. & Cédric, D. (2020). Radical depolymerization of alginate extracted from moroccan brown seaweed *Bifurcaria bifurcata*. *Applied Sciences*, 10, 1–12.
- Speijer, D., Lukeš, J. & Eliáš, M. (2015). Sex is a ubiquitous, ancient, and inherent attribute of eukaryotic life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 8827–8834.
- Stainley, N.F. (2006). Agars. Stephen, A.M., Philips, G.O. & Williams, P.A. (eds). *Food Science and Technology: Food Polysaccharides and Their Applications*, Second. Taylor & Francis, 217–238.

- Stefanovic, B. (2013). RNA protein interactions governing expression of the most abundant protein in human body, type I collagen. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 4, 535–545.
- Stiger-Pouvreau, V., Bourgougnon, N. & Deslandes, E. (2016). Carbohydrates from seaweeds. Fleurence, J. & Levine, I.A. (eds). *Seaweed in Health and Disease Prevention*. Academic Press, 223–274.
- Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K.I., Tajima, A., Iwase, T. & Mizunoe, Y. (2013). *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *Journal of Bacteriology*, 195, 1645–1655.
- Sujina, M., Soumya, J., Research, M.W.-W.J. of P. & 2016, U. (2016). Assessing the anticancer, anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant potential of bioactive compounds present in marine algae *Ulva lactuca*. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 1482–1500.
- Sun, D., Accavitti, M.A. & Bryers, J.D. (2005). Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12, 93–100.
- Suresh Kumar, K., Ganesan, K., Selvaraj, K. & Subba Rao, P. V. (2014). Studies on the functional properties of protein concentrate of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty - An edible seaweed. *Food Chemistry*, 153, 353–360.
- Suto, M., Masutomi, H., Ishihara, K. & Masaki, H. (2019). A potato peel extract stimulates type I collagen synthesis via Akt and ERK signaling in normal human dermal fibroblasts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42, 1510–1516.
- Sysa, P., Potter, J.J., Liu, X. & Mezey, E. (2009). Transforming growth factor- $\beta$ 1 up-regulation of human  $\alpha$ 1(I) collagen is mediated by Sp1 and Smad2 transacting factors. *DNA and Cell Biology*, 28, 425–434.
- Tabarsa, M., Han, J.H., Kim, C.Y. & You, S.G. (2012). Molecular characteristics and immunomodulatory activities of water-soluble sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa*. *Journal of Medicinal Food*, 15, 135–144.
- Tabarsa, M., You, S., Dabaghian, E.H. & Surayot, U. (2018). Water-soluble polysaccharides from *Ulva intestinalis*: Molecular properties, structural elucidation and immunomodulatory activities. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 599–608.
- Tachdjian, G., Brisset, S., Courtot, A.-M., Schoëvaërt, D. & Tosca, L.B.. (2016). Peau et annexes cutanées. *Embryologie et Histologie Humaines*. Elsevier, Paris, 121–142.
- Talwar, H.S., Griffiths, C.E.M., Fisher, G., Hamilton, T.A. & Voorhees, J. (1995). Reduced type I and type III procollagens photodamaged adult human skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 105, 285–290.
- Tang, R. (2017). Modifications moléculaires et organisationnelles du derme au cours des vieillissements intrinsèque et photo-induit. Thèse de l'Université de Toulouse 3 Paul Sabatier - Spécialité en Sciences et génie des matériaux. Soutenue le 27 février 2017 à Toulouse.
- Taylor, S.C. & Posch, A. (2014). The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *BioMed Research International*, 2014, 361590.
- Telles, C.B.S., Mendes-Aguiar, C., Fidelis, G.P., Frasson, A.P., Pereira, W.O., Scortecci, K.C., Camara, R.B.G., Nobre, L.T.D.B., Costa, L.S., Tasca, T. & Rocha, H.A.O. (2018). Immunomodulatory effects and antimicrobial activity of heterofucans from *Sargassum filipendula*. *Journal of Applied Phycology*, 30, 569–578.

- Terme, N., Chénais, B., Fournière, M., Bourgougnon, N. & Bedoux, G. (2019). Algal derived functional lipids and their role in promoting health. Rajauria, G. & Yuan, Y. V (eds). *Recent Advancements in Micro and Macroalgal Processing: Food and Health Perspectives*. Wiley.
- Terme, N., Hardouin, K., Cortès, H.P., Peñuela, A., Freile-Pelegrín, Y., Robledo, D., Bedoux, G. & Bourgougnon, N. (2020). Emerging seaweed extraction techniques: Enzyme-assisted extraction a key step of seaweed biorefinery? Torres, M.D., Kraan, S. & Dominguez, H. (eds). *Sustainable Seaweed Technologies*. Elsevier, 225–256.
- Thanh, T.T.T., Quach, T.M.T., Nguyen, T.N., Vu Luong, D., Bui, M.L. & Tran, T.T. Van. (2016). Structure and cytotoxic activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva lactuca*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 695–702.
- Thi, Q., Thu, M., Luong, D.V., Nu, N.T., Thi, T., Van, T., Ly, B.M., Thi, T. & Thuy, T. (2016). Effect of sulfation on the structure and anticoagulant activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva reticulata*. *Journal of Science and Technology*, 54, 373–379.
- Tian, H., Yin, X., Zeng, Q., Zhu, L. & Chen, J. (2015). Isolation, structure, and surfactant properties of polysaccharides from *Ulva lactuca* L. from South China sea. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 577–582.
- Tirichine, L. & Bowler, C. (2011). Decoding algal genomes: Tracing back the history of photosynthetic life on Earth. *Plant Journal*, 66, 45–57.
- Tran, T.T. Van., Truong, H.B., Tran, N.H.V., Quach, T.M.T., Nguyen, T.N., Bui, M.L., Yuguchi, Y. & Thanh, T.T.T. (2018). Structure, conformation in aqueous solution and antimicrobial activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva reticulata*. *Natural Product Research*, 32, 2291–2296.
- Trivedi, N., Gupta, V., Reddy, C.R.K. & Jha, B. (2013). Enzymatic hydrolysis and production of bioethanol from common macrophytic green alga *Ulva fasciata* Delile. *Bioresource Technology*, 150, 106–112.
- Trojanowska, M., LeRoy, E.C., Eckes, B. & Krieg, T. (1998). Pathogenesis of fibrosis: Type 1 collagen and the skin. *Journal of Molecular Medicine*, 76, 266–274.
- Trompezinski, S., Weber, S., Cadars, B., Larue, F., Ardiet, N., Chavagnac-Bonneville, M., Sayag, M. & Jourdan, E. (2016). Assessment of a new biological complex efficacy on dysseborrhea, inflammation, and *Propionibacterium acnes* proliferation. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 9, 233–239.
- Tsugita, A. & Scheffler, J.-J. (1982). A Rapid Method for Acid Hydrolysis of Protein with a Mixture of Trifluoroacetic Acid and Hydrochloric Acid. *European Journal of Biochemistry*, 124, 585–588.
- Tyner, H. & Patel, R. (2016). *Propionibacterium acnes* biofilm - A sanctuary for *Staphylococcus aureus*? *Anaerobe*, 40, 63–67.
- Ul-Haq, I., Butt, M.S., Amjad, N., Yasmin, I. & Rasul Suleria, H.A. (2019). Marine-Algal Bioactive Compounds. Ravishankar, G.A. & Ambati, R.R. (eds). *Handbook of Algal Technologies and Phytochemicals*. CRC Press, 71–80.
- Uy, S.F., Easteal, A.J., Farid, M.M., Keam, R.B. & Conner, G.T. (2005). Seaweed processing using industrial single-mode cavity microwave heating: A preliminary investigation. *Carbohydrate Research*, 340, 1357–1364.
- Van Der Rest, M. & Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *The FASEB Journal*, 5, 2814–2823.
- Van Doren, S.R. (2015). Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biology*, 44–46, 224–231.

- Vandecandelaere, I., Depuydt, P., Nelis, H.J. & Coenye, T. (2014). Protease production by *Staphylococcus epidermidis* and its effect on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Pathogens and Disease*, 70, 321–331.
- Vandenesch, F., Crane, J.K., Potempa, J., Leheste, J.R., Ruvolo, K.E., Chrostowski, J.E., Rivera, K., Husko, C., Miceli, A., Selig, M.K., Brüggemann, H. & Torres, G. (2017). *P. acnes*-Driven Disease Pathology: Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 81.
- Varani, J., Dame, M.K., Rittie, L., Fligiel, S.E.G., Kang, S., Fisher, G.J. & Voorhees, J.J. (2006). Decreased collagen production in chronologically aged skin: Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *American Journal of Pathology*, 168, 1861–1868.
- Veeraperumal, S., Qiu, H.M., Zeng, S.S., Yao, W.Z., Wang, B.P., Liu, Y. & Cheong, K.L. (2020). Polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* promote the HaCaT keratinocytes wound healing by polarised and directional cell migration. *Carbohydrate Polymers*, 241, 116310.
- Venkatesan, J., Lowe, B., Anil, S., Manivasagan, P., Kheraif, A.A.A., Kang, K.H. & Kim, S.K. (2015). Seaweed polysaccharides and their potential biomedical applications. *Starch*, 67, 381–390.
- Venus, M., Waterman, J. & McNab, I. (2011). Basic physiology of the skin. *Surgery*, 29, 471–474.
- Vera, J., Castro, J., Gonzalez, A. & Moenne, A. (2011). Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Marine Drugs*, 9, 2514–25.
- Verrecchia, F., Pessah, M., Atfi, A. & Mauviel, A. (2000). Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling in human dermal fibroblasts *via* AP-1 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 30226–30231.
- Verrecchia, F., Wagner, E. & Mauviel, A. (2002). Distinct involvement of the Jun-N-terminal kinase and NF-kappaB pathways in the repression of the human *COL1A2* gene by TNF-alpha. *EMBO Reports*, 3, 1069–74.
- Verrecchia, F. & Mauviel, A. (2004). TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$ : Antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. *Cellular Signalling*, 16, 873–880.
- Viola, R., Nyvall, P. & Pedersén, M. (2001). The unique features of starch metabolism in red algae. *The Royal Society*, 268, 1417–1422.
- Vitellaro-Zuccarello, L., Garbelli, R. & Rossi, V.D.P. (1992). Immunocytochemical localization of collagen types I, III, IV, and fibronectin in the human dermis - Modifications with ageing. *Cell & Tissue Research*, 268, 505–511.
- Vlassova, N., Han, A., Zenilman, J.M., James, G. & Lazarus, G.S. (2011). New horizons for cutaneous microbiology: the role of biofilms in dermatological disease. *British Journal of Dermatology*, 165, 751–759.
- Vuillermoz, B., Wegrowski, Y., Contet-Audonneau, J.L., Danoux, L., Pauly, G. & Maquart, F.X. (2005). Influence of aging on glycosaminoglycans and small leucine-rich proteoglycans production by skin fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 277, 63–72.
- Vuorio, E. & De Crombrughe, B. (1990). The Family of Collagen Genes. *Annual Review of Biochemistry*, 59, 837–872.

- Wahlström, N., Nylander, F., Malmhäll-Bah, E., Sjövoid, K., Edlund, U., Westman, G. & Albers, E. (2020). Composition and structure of cell wall ulvans recovered from *Ulva spp.* along the Swedish west coast. *Carbohydrate Polymers*, 233, 115852.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H.G., Hreggvidsson, G.O., Jónsson, J.Ó., Thorkelsson, G. & Ólafsdóttir, G. (2010). Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*. *Food Science and Technology*, 43, 1387–1393.
- Wang, Z., MacLeod, D.T. & Di Nardo, A. (2012). Commensal Bacteria Lipoteichoic Acid Increases Skin Mast Cell Antimicrobial Activity against Vaccinia Viruses. *The Journal of Immunology*, 189, 1551–1558.
- Wang, X., Zhang, Z., Yao, Z., Zhao, M. & Qi, H. (2013). Sulfation, anticoagulant and antioxidant activities of polysaccharide from green algae *Enteromorpha linza*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 225–230.
- Wang, L., Wang, X., Wu, H. & Liu, R. (2014a). Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. *Marine Drugs*, 12, 4984–5020.
- Wang, Y., Kuo, S., Shu, M., Yu, J., Huang, S., Dai, A., Two, A., Gallo, R.L. & Huang, C.M. (2014b). *Staphylococcus epidermidis* in the human skin microbiome mediates fermentation to inhibit the growth of *Propionibacterium acnes*: Implications of probiotics in acne vulgaris. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 411–424.
- Wang, H.-M.D., Chen, C.-C. & Huynh, P. (2015). Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource Technology*, 184, 355–362.
- Wang, Y., Kao, M.S., Yu, J., Huang, S., Marito, S., Gallo, R.L. & Huang, C.M. (2016a). A precision microbiome approach using sucrose for selective augmentation of *Staphylococcus epidermidis* fermentation against *Propionibacterium acnes*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1870.
- Wang, J., Hu, S., Nie, S., Yu, Q. & Xie, M. (2016b). Reviews on Mechanisms of *in Vitro* Antioxidant Activity of Polysaccharides. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 5692852.
- Wang, B., McHugh, B.J., Qureshi, A., Campopiano, D.J., Clarke, D.J., Fitzgerald, J.R., Dorin, J.R., Weller, R. & Davidson, D.J. (2017). IL-1 $\beta$ -Induced Protection of Keratinocytes against *Staphylococcus aureus*-Secreted Proteases Is Mediated by Human  $\beta$ -Defensin 2. *Journal of Investigative Dermatology*, 137, 95–105.
- Wang, L., Lee, W., Oh, J., Cui, Y., Ryu, B. & Jeon, Y.-J. (2018). Protective Effect of Sulfated Polysaccharides from Celluclast-Assisted Extract of *Hizikia fusiforme* Against Ultraviolet B-Induced Skin Damage by Regulating NF- $\kappa$ B, AP-1, and MAPKs Signaling Pathways *In Vitro* in Human Dermal Fibroblasts. *Marine Drugs*, 16, 239.
- Wang, L., Jayawardena, T.U., Yang, H.-W., Lee, H.-G. & Jeon, Y.-J. (2020). The Potential of Sulfated Polysaccharides Isolated from the Brown Seaweed *Ecklonia maxima* in Cosmetics: Antioxidant, Anti-melanogenesis, and Photoprotective Activities. *Antioxidants*, 9, 724.
- Wang, L., Oh, J.Y., Lee, W.W. & Jeon, Y.J. (2021). Fucoidan isolated from *Hizikia fusiforme* suppresses ultraviolet B-induced photodamage by down-regulating the expressions of matrix metalloproteinases and pro-inflammatory cytokines via inhibiting NF- $\kappa$ B, AP-1, and MAPK signaling pathways. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 751–759.
- Wanke, I., Steffen, H., Christ, C., Krismer, B., Götz, F., Peschel, A., Schaller, M. & Schitteck, B. (2011). Skin Commensals Amplify the Innate Immune Response to Pathogens by Activation of Distinct Signaling Pathways. *Journal of Investigative Dermatology*, 131, 382–390.



- Waters, C.M. & Bassler, B.L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 319–346.
- Wei, D., Zhang, L., Williams, D.L. & Browder, W. (2002a). Glucan stimulates human dermal fibroblast collagen biosynthesis through a nuclear factor-1 dependent mechanism. *Wound Repair and Regeneration*, 10, 161–168.
- Wei, D., Williams, D. & Browder, W. (2002b). Activation of AP-1 and SP1 correlates with wound growth factor gene expression in glucan-treated human fibroblasts. *International Immunopharmacology*, 2, 1163–1172.
- Wells, M.L., Potin, P., Craigie, J.S., Raven, J.A., Merchant, S.S., Helliwell, K.E., Smith, A.G., Camire, M.E. & Brawley, S.H. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology*, 29, 949–982.
- Wen, Y., Gu, J., Chakrabarti, S.K., Aylor, K., Marshall, J., Takahashi, Y., Yoshimoto, T. & Nadler, J.L. (2007). The role of 12/15-lipoxygenase in the expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in macrophages. *Endocrinology*, 148, 1313–1322.
- Wiestner, M., Krieg, T., Hörlein, D., Glanville, R., Fietzek, P. & Müller, P. (1979). Inhibiting effect of procollagen peptides on collagen biosynthesis in fibroblast cultures. *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 7016–7023.
- Wijesekara, I., Lang, M., Marty, C., Gemin, M.-P., Boulho, R., Douzenel, P., Wickramasinghe, I., Bedoux, G. & Bourgougnon, N. (2017). Different extraction procedures and analysis of protein from *Ulva* sp. in Brittany, France. *Journal of Applied Phycology*, 29, 2503–2511.
- Wijesinghe, W.A.J.P., Athukorala, Y. & Jeon, Y.J. (2011). Effect of anticoagulative sulfated polysaccharide purified from enzyme-assistant extract of a brown seaweed *Ecklonia cava* on Wistar rats. *Carbohydrate Polymers*, 86, 917–921.
- Wilgus, T.A., Roy, S. & McDaniel, J.C. (2013). Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Advances in Wound Care*, 2, 379–388.
- Wilkinson, H.N. & Hardman, M.J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes: Cellular Mechanisms of Wound Repair. *Open Biology*, 10, 200223.
- Williams, R.J., Henderson, B., Sharp, L.J. & Nair, S.P. (2002). Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*, 70, 6805–6810.
- Wilson, M. & Houghton, E.R. (2005). An introduction to the human–microbe symbiosis. *Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease*. Cambridge University Press, 1–50.
- Wilson, M. (2018). The Indigenous Microbiota of the Skin. Garland Science (ed). *The Human Microbiota in Health and Disease: An Ecological and Community-based Approach*. Taylor & Francis, 86–95.
- Wingfield, P.T. (2016). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, 84, A.3F.1-A.3F.9.
- Witte, M.B. & Barbul, A. (1997). General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America*, 77, 509–528.
- Wolff, S.P. & Dean, R.T. (1986). Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochemical Journal*, 234, 399–403.
- Wong, W. (2015). Limiting TGF- $\beta$  signaling to prevent fibrosis. *Science Signaling*, 8, ec34.

- Xia, X., Li, Z., Liu, K., Wu, Y., Jiang, D. & Lai, Y. (2016). Staphylococcal LTA-induced miR-143 inhibits *Propionibacterium acnes* - Mediated inflammatory response in skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 136, 621–630.
- Xian, L.J., Chowdhury, S.R., Bin Saim, A. & Idrus, R.B.H. (2015). Concentration-dependent effect of platelet-rich plasma on keratinocyte and fibroblast wound healing. *Cytotherapy*, 17, 293–300.
- Xu, J. & Clark, R.A.F. (1996). Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. *Journal of Cell Biology*, 132, 239–249.
- Xu, J., Xu, L.L., Zhou, Q.W., Hao, S.X., Zhou, T. & Xie, H.J. (2015). Isolation, purification, and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 1026–1030.
- Xu, H., Timares, L. & Elmets, C.A. (2019). Host Defenses in Skin. Rich, R.R., Fleisher, T.A., Shearer, W.T., Schroeder, H.W., Frew, A.J. & Weyand, C.M. (eds). *Clinical Immunology*, 5th edn. 273-283.e1.
- Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C. & Attia, H. (2013). Effect of extraction conditions on the yield and purity of ulvan extracted from *Ulva lactuca*. *Food Hydrocolloids*, 31, 375–382.
- Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Barthélemy, J.P., Paquot, M., Blecker, C. & Attia, H. (2014). Impact of extraction procedures on the chemical, rheological and textural properties of ulvan from *Ulva lactuca* of Tunisia coast. *Food Hydrocolloids*, 40, 53–63.
- Yaich, H., Amira, A. Ben., Abbes, F., Bouaziz, M., Besbes, S., Richel, A., Blecker, C., Attia, H. & Garna, H. (2017). Effect of extraction procedures on structural, thermal and antioxidant properties of ulvan from *Ulva lactuca* collected in Monastir coast. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1430–1439.
- Yamamoto, M. (1980). Physicochemical studies on sulfated polysaccharides extracted from seaweeds at various temperatures. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44, 589–593.
- Yamamoto, K., Murphy, G. & Troeberg, L. (2015). Extracellular regulation of metalloproteinases. *Matrix Biology*, 44–46, 255–263.
- Yamane, K., Ihn, H., Kubo, M. & Tamaki, K. (2002). Increased transcriptional activities of transforming growth factor  $\beta$  receptors in scleroderma fibroblasts. *Arthritis and Rheumatism*, 46, 2421–2428.
- Yan, C. & Boyd, D.D. (2007). Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *Journal of Cellular Physiology*, 211, 19–26.
- Yan, X., Feng, J. & Shi, B. (2007). Effects of Connective Tissue Growth Factor and Collagen Type I Scleroderma. *Journal of Nanjing Medical University*, 21, 175–179.
- Yanez, D.A., Lacher, R.K., Vidyarthi, A. & Colegio, O.R. (2017). The role of macrophages in skin homeostasis. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 469, 455–463.
- Yang, X., Smith, K. & Lomas, L. (2010). Comparison of the Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gel System and Standard Coomassie Staining Procedures for Running and Imaging Protein Gels. Bio-Rad report.
- Yang, J.-J., Chang, T.-W., Jiang, Y., Kao, H.-J., Chiou, B.-H., Kao, M.-S. & Huang, C.-M. (2018). Commensal *Staphylococcus aureus* Provokes Immunity to Protect against Skin Infection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1290.



- Yim, M.-J., Lee, J.M., Kim, H.-S., Choi, G., Kim, Y.-M., Lee, D.-S. & Choi, I.-W. (2020). Inhibitory Effects of a *Sargassum miyabei* Yendo on *Cutibacterium acnes*-Induced Skin Inflammation. *Nutrients*, 12, 2620.
- Yu, Y., Champer, J., Agak, G.W., Kao, S., Modlin, R.L. & Kim, J. (2016). Different *Propionibacterium acnes* Phylotypes Induce Distinct Immune Responses and Express Unique Surface and Secreted Proteomes. *Journal of Investigative Dermatology*, 136, 2221–2228.
- Yuan, W., Yufit, T., Li, L., Mori, Y., Chen, S.J. & Varga, J. (1999). Negative modulation of  $\alpha 1(I)$  procollagen gene expression in human skin fibroblasts: transcriptional inhibition by interferon- $\gamma$ . *Journal of Cellular Physiology*, 179, 97–108.
- Yuki, T., Yoshida, H., Akazawa, Y., Komiya, A., Sugiyama, Y. & Inoue, S. (2011). Activation of TLR2 enhances tight junction barrier in epidermal keratinocytes. *The Journal of Immunology*, 187, 3230–3237.
- Yvin, J.-C., Levasseur, F. & Hud'Homme, F. (1999). Use of laminarin and oligosaccharides derived therefrom in cosmetics and for preparing a skin treatment drug. Patent US5980916A.
- Zeeuwen, P.L., Boekhorst, J., van den Bogaard, E.H., de Koning, H.D., van de Kerkhof, P.M.C., Saulnier, D.M., van Swam, I.I., van Hijum, S.A.F.T., Kleerebezem, M., Schalkwijk, J. & Timmerman, H.M. (2012). Microbiome dynamics of human epidermis following skin barrier disruption. *Genome Biology*, 13, R101.
- Zhang, H.-J., Mao, W.-J., Fang, F., Li, H.-Y., Sun, H.-H., Chen, Y. & Qi, X.-H. (2008). Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. *Carbohydrate Polymers*, 71, 428–434.
- Zhang, Z., Wang, X., Yu, S., Yin, L., Zhao, M. & Han, Z. (2011). Synthesized oversulfated and acetylated derivatives of polysaccharide extracted from *Enteromorpha linza* and their potential antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 1012–1015.
- Zhang, S. & Duan, E. (2018). Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell transplantation*, 27, 729–738.
- Zhao, L., Dong, Y., Chen, G. & Hu, Q. (2010). Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 80, 783–789.
- Zhao, D., Xu, J. & Xu, X. (2018). Bioactivity of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* using a novel procedure with high yield. *Food Chemistry*, 245, 911–918.
- Zhong, H., Gao, X., Cheng, C., Liu, C., Wang, Q. & Han, X. (2020). The Structural Characteristics of Seaweed Polysaccharides and Their Application in Gel Drug Delivery Systems. *Marine Drugs*, 18, 658.
- Zouboulis, C.C. (2004). Acne and sebaceous gland function. *Clinics in Dermatology*, 22, 360–366.



# **Annexes**



# Annexes

## Articles publiés dans le cadre des travaux de thèse



metabolites



Article

### Production of Active Poly- and Oligosaccharidic Fractions from *Ulva* sp. by Combining Enzyme-Assisted Extraction (EAE) and Depolymerization

Mathilde Fournière <sup>1,2,\*</sup> , Thomas Latire <sup>1</sup>, Marie Lang <sup>2</sup> , Nolwenn Terme <sup>2</sup>,  
Nathalie Bourgougnon <sup>2</sup> and Gilles Bedoux <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Université Catholique de l'Ouest Bretagne Nord, 22200 Guingamp, France; tlatire@uco.fr

<sup>2</sup> Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884 Université Bretagne Sud, 56000 Vannes, France; marie.lang@univ-ubs.fr (M.L.); nolwenn.termes@univ-ubs.fr (N.T.); nathalie.bourgougnon@univ-ubs.fr (N.B.); gilles.bedoux@univ-ubs.fr (G.B.)

\* Correspondence: mathilde.fourniere@univ-ubs.fr

Received: 19 July 2019; Accepted: 10 September 2019; Published: 12 September 2019



**Abstract:** Data on fractionation and depolymerization of the matrix ulvan polysaccharides, and studies on the biological activities on skin cells, are very scarce. In this work, crude ulvans were produced by using EAE (enzyme-assisted extraction) and compared to maceration (an established procedure). After different fractionation procedures—ethanolic precipitation, dialysis, or ammonium sulfate precipitation—the biochemical composition showed that EAE led to an increased content in ulvans. Coupling EAE to sulfate ammonium precipitation led to protein enrichment. Oligosaccharides were obtained by using radical depolymerization by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ion-exchange resin depolymerization. Sulfate groups were partially cleaved during these chemical treatments. The potential bioactivity of the fractions was assessed using a lipoxygenase inhibition assay for anti-inflammatory activity and a WST-1 assay for human dermal fibroblast viability and proliferation. All ulvan extracts, poly- and oligosaccharidic fractions from EAE, expanded the fibroblast proliferation rate up to 62%. Our research emphasizes the potential use of poly- and oligosaccharidic fractions of *Ulva* sp. for further development in cosmetic applications.

**Keywords:** green seaweed; polysaccharide; ulvan; enzyme-assisted extraction; endo-protease Protamex<sup>®</sup>; depolymerization; human dermal fibroblast; lipoxygenase





#### 1. Introduction

Green seaweed from the *Ulva* genus represents an important biomass of the European coasts due to its proliferation. Algal blooms due to marine eutrophication have a detrimental impact on the environment and local economy, especially in Brittany, France [1,2]. For now, *Ulva* sp. is less up-graded in Brittany and used as soil amendment and animal feed or is simply degraded by combustion or by letting them rot [1]. Seaweeds are sources of high value-added products with potential for the natural cosmetic industry [3–8]. The possible use of green seaweeds as an important and abundant source of cosmeceutical bioactive compounds has emerged in recent years [9].

Interest in extraction, fractionation, and purification of high value compounds from *Ulva* sp. has risen significantly for the exploitation of this natural resource. The cell wall of *Ulva* sp. is composed of several polysaccharide types constituting the skeleton—celluloses, hemicelluloses, mannans, and xylans—and the matrix phase—ulvans, xyloarabinogalactans, and glucuronoxylorhamnans [10,11]. Water-soluble sulfated polysaccharides, known as ulvans, are mainly composed of sulfated rhamnose,

Review

# *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*: Two Major Sentinels of Skin Microbiota and the Influence of Cosmetics

Mathilde Fournière <sup>1,2,\*</sup> , Thomas Latire <sup>1,2</sup> , Djouhar Souak <sup>3,4</sup>, Marc G. J. Feuilloley <sup>3</sup>  and Gilles Bedoux <sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines LBCM EA 3884, IUEM, Université Bretagne Sud, 56000 Vannes, France; tlatire@uco.fr (T.L.); gilles.bedoux@univ-ubs.fr (G.B.)

<sup>2</sup> Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines LBCM EA 3884, IUEM, Université Catholique de l'Ouest Bretagne Nord, 22200 Guingamp, France

<sup>3</sup> Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement LMSM EA4312, Université de Rouen Normandie, 27000 Évreux, France; djouhar.souak@univ-rouen.fr (D.S.); marc.feuilleley@univ-rouen.fr (M.G.J.F.)

<sup>4</sup> BASF Beauty Care Solutions France SAS, 69007 Lyon, France

\* Correspondence: mathilde.fourniere@univ-ubs.fr

Received: 25 September 2020; Accepted: 5 November 2020; Published: 7 November 2020



**Abstract:** Dermatological and cosmetics fields have recently started to focus on the human skin microbiome and microbiota, since the skin microbiota is involved in the health and dysbiosis of the skin ecosystem. Amongst the skin microorganisms, *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*, both commensal bacteria, appear as skin microbiota sentinels. These sentinels have a key role in the skin ecosystem since they protect and prevent microbiota disequilibrium by fighting pathogens and participate in skin homeostasis through the production of beneficial bacterial metabolites. These bacteria adapt to changing skin microenvironments and can shift to being opportunistic pathogens, forming biofilms, and thus are involved in common skin dysbiosis, such as acne or atopic dermatitis. The current evaluation methods for cosmetic active ingredient development are discussed targeting these two sentinels with their assets and limits. After identification of these objectives, research of the active cosmetic ingredients and products that maintain and promote these commensal metabolisms, or reduce their pathogenic forms, are now the new challenges of the skincare industry in correlation with the constant development of adapted evaluation methods.




**Keywords:** skin microbiota; biofilm; cosmetic; *Staphylococcus epidermidis*; *Cutibacterium acnes*

## 1. Introduction

Research on human microbiota in dermatology started in the 1950's with Kligman, with the improvement in cell culture [1]. In 2008, the National Institutes of Health launched the five-year Human Microbiome Project with the objective to sequence human microbiome components. Emergence of new technologies, such as next-generation sequencing (NGS), enable the comprehensive study of the human microbiome [2,3]. The microbiome corresponds to the set of genomes of microorganisms in symbiosis with the human host, including microorganisms, alive or dead, and free DNA, whereas microbiota refers to microorganisms living in or on a defined ecosystem [4]. Human microbiota, mainly established on the skin, oral and vaginal mucosa, as well as in the respiratory, urinary and gastrointestinal tracts, have fundamental roles in health and diseases [5,6]. The human adult skin microbiota is comprised of diverse microorganisms, including bacteria, fungi [7,8], yeasts, viruses [9], archaea [10] and mites, principally *Demodex* [11].

## Article

# Poly- and Oligosaccharide *Ulva* sp. Fractions from Enzyme-Assisted Extraction Modulate the Metabolism of Extracellular Matrix in Human Skin Fibroblasts: Potential in Anti-Aging Dermo-Cosmetic Applications

Mathilde Fournière <sup>1,2,\*</sup> , Gilles Bedoux <sup>1</sup> , Nicolas Lebonvallet <sup>3</sup>, Raphaël Leschiera <sup>3</sup>, Claudie Le Goff-Pain <sup>2</sup>, Nathalie Bourgougnon <sup>1</sup> and Thomas Latire <sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup> Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884, IUEM, Université Bretagne Sud, 56000 Vannes, France; gilles.bedoux@univ-ubs.fr (G.B.); nathalie.bourgougnon@univ-ubs.fr (N.B.); tlatire@uco.fr (T.L.)

<sup>2</sup> Université Catholique de l'Ouest Bretagne Nord, 22200 Guingamp, France; clegoff@uco.fr

<sup>3</sup> Laboratoire Interaction Epithéliums Neurones, EA 4686, Université Bretagne Occidentale, 29200 Brest, France; nicolas.lebonvallet@univ-brest.fr (N.L.); raphael.leschiera@univ-brest.fr (R.L.)

\* Correspondence: mathilde.fourniere@univ-ubs.fr



**Citation:** Fournière, M.; Bedoux, G.; Lebonvallet, N.; Leschiera, R.; Le Goff-Pain, C.; Bourgougnon, N.; Latire, T. Poly- and Oligosaccharide *Ulva* sp. Fractions from Enzyme-Assisted Extraction Modulate the Metabolism of Extracellular Matrix in Human Skin Fibroblasts: Potential in Anti-Aging Dermo-Cosmetic Applications. *Mar. Drugs* **2021**, *19*, 156. <https://doi.org/10.3390/md19030156>

Academic Editor: Laurent Vandanjon

Received: 4 March 2021

Accepted: 12 March 2021

Published: 17 March 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** *Ulva* sp. is known to be a source of bioactive compounds such as ulvans, but their biological activity on human dermal fibroblast extracellular matrix (ECM) is poorly reported. In this work, the regulation of ECM has been investigated for the first time at both proteomic and transcriptomic levels in normal human skin dermal fibroblasts, after 48 h of incubation with poly- and oligosaccharide fractions from *Ulva* sp. obtained after enzyme-assisted extraction and depolymerization. Cell proliferation enhancement (up to +68%) without exhibiting any cytotoxic effect on fibroblasts was demonstrated at 50 and 1000 µg/mL by both fractions. At the proteomic level, polysaccharide fractions at 1000 µg/mL enhanced the most the synthesis of glycosaminoglycans (GAGs, up to +57%), total collagen, especially types I (up to +217%) and III, as well as the synthesis and activity of MMP-1 (Matrix Metalloproteinase-1, up to +309%). In contrast, oligosaccharide fractions had no effect on GAGs synthesis but exhibited similarities for collagens and MMP-1 regulation. At the transcriptomic level, the decrease of *COL1A1* and *COL1A2* expression, and increase of *COL3A1* and *MMP-1* expression, confirmed the modulation of ECM metabolism by both fractions. Our research emphasizes that poly- and oligosaccharide *Ulva* sp. fractions exhibit interesting biological activities and supports their potential use in the area of skin renewal for anti-aging dermo-cosmetic applications.

**Keywords:** collagen; extracellular matrix; human dermal fibroblast; matrix metalloproteinase; seaweed; *Ulva* sp.

## 1. Introduction

Large-scale green tides caused by *Ulva* sp. have been recurrent in Brittany (France) due to marine eutrophication. Strandings of green seaweed have profound adverse ecological impacts including the alteration of the ecosystem structure, the reduction of indigenous biodiversity, and economic losses [1,2]. Except for utilization as soil amendment, animal feed, or simple degradation by decay or combustion from stranding events, very little is known about the valorization of *Ulva* sp. in human health [1]. However, *Ulva* sp. is an important source of compounds such as ulvans. Ulvans, water-soluble sulfated cell wall polysaccharides, mainly composed of rhamnose, uronic acids, and xylose, can represent up to 36% of *Ulva* dry weight [3]. The two main repeated disaccharide units of ulvan are aldobiuronic acids (ulvanobiuronic acids), type A: β-D-glucuronic acid (1,4)-linked to α-L-rhamnose 3-sulfate, and type B: α-L-iduronic acid (1,4)-linked to α-L-rhamnose 3-sulfate. Minor disaccharides aldobioses, referred as ulvanobioses (type U) can also be found in



**Titre :** Extraction et évaluation des propriétés biologiques des ulvanes et oligo-ulvanes de l'algue verte *Ulva* sp. : actions sur le métabolisme de cellules cutanées et sur le microbiote cutané

**Mots clés :** extraction assistée par enzyme, ulvanes, fibroblastes dermiques humains, matrice extracellulaire, microbiote cutané, *Cutibacterium acnes*

**Résumé :** Les ulvanes sont des polysaccharides matriciels sulfatés constitutifs de la paroi de l'algue verte *Ulva* sp.. Bien que proliférative et quantitativement disponible, *Ulva* sp. est peu valorisée avec des applications dans des domaines à faible valeur ajoutée. Ce projet de thèse a pour objectif la production de fractions enrichies en ulvanes et en oligo-ulvanes dans le but d'évaluer leurs propriétés biologiques sur le système cutané.

Les fractions d'ulvanes ont été produites par macération et extraction assistée par enzyme suivie de différents procédés de purification : précipitation éthanolique et dialyse. Des dépolymérisations radicalaire et acide ont permis d'obtenir des fractions d'oligo-ulvanes. Ces fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes stimulent la prolifération de fibroblastes dermiques humains. Une augmentation de la synthèse protéique des

composants matriciels dont les collagènes de type I et III, et les glycosaminoglycans a été mise en évidence. Les fractions stimulent également l'expression, la synthèse et l'activité enzymatique de la MMP-1. Au niveau du microbiote cutané, ces fractions n'altèrent pas la croissance des bactéries commensales *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. acnes*, mais peuvent modifier la formation de biofilm. Les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes diminuent également le potentiel inflammatoire des kératinocytes HaCaT induit par *C. acnes*.

Ainsi, les travaux ont démontré que les fractions d'ulvanes et d'oligo-ulvanes présentent des activités biologiques prometteuses pour des applications dermo-cosmétiques dans le cadre de stratégies de réparation tissulaire, anti-vieillesse, ou anti-inflammatoire, dans le respect du microbiote commensal cutané.

**Title:** Extraction and evaluation of biological properties of ulvans and oligo-ulvans from green seaweed *Ulva* sp.: actions on the metabolism of skin cells and on skin microbiota

**Keywords:** enzyme-assisted extraction, ulvans, human dermal fibroblasts, extracellular matrix, skin microbiota, *Cutibacterium acnes*

**Abstract:** Ulvans are matrix sulfated polysaccharides constitutive of green seaweed *Ulva* sp. cell wall. Although proliferative and quantitatively available, *Ulva* sp. is little valued with applications in low added value sectors. The objective of this project is to produce fractions enriched in ulvans and oligo-ulvans in order to evaluate their biological properties on cutaneous system.

Ulvans fractions were produced by maceration and enzyme-assisted extraction followed by different purification processes: ethanolic precipitation and dialysis. Radical and acid depolymerization processes allowed to obtain oligo-ulvan fractions. Ulvan and oligo-ulvan fractions have been shown to stimulate human dermal fibroblasts proliferation. An increase in

the synthesis of extracellular matrix components such as type I and III collagens, and also of glycosaminoglycans has been demonstrated. Fractions also stimulate the expression, synthesis and MMP-1 enzymatic activity. At skin microbiota level, the fractions do not alter the growth of commensal bacteria *S. epidermidis*, *S. aureus* and *C. acnes*, but may alter the biofilm formation. Ulvan and oligo-ulvan fractions also reduce the inflammatory potential of HaCaT keratinocytes induced by *C. acnes*.

Thus, this work has shown that the ulvan and oligo-ulvan fractions exhibit promising biological activities for dermo-cosmetic applications in tissue repair, anti-ageing or anti-inflammatory strategies while preserving commensal skin microbiota.