



LA ROCHELLE UNIVERSITE

ÉCOLE DOCTORALE

Sciences pour l'Environnement Gay-Lussac

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266 CNRS-ULR

Equipe Biotechnologies et Chimie des Bioressources pour la Santé (BCBS)

THESE CONFIDENTIELLE

Présentée par :

Justine BODIN

Soutenue le 26 mai 2020

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de la Rochelle

Discipline : Valorisation chimique et biologique des agroressources

Valorisation des fractions issues d'un procédé industriel éco-compatible de raffinage de macroalgues marines

JURY :

Mme Rozenn RAVALLEC, Professeur à l'Université de Lille 1, **Rapportrice**

Mme Véronique PALLET, Professeur à Bordeaux INP, **Rapportrice**

Mme Ingrid ARNAUDIN, Professeur à l'Université de La Rochelle, **Examinatrice**

M. Guillaume PIERRE, MCF HDR à l'Université Clermont-Auvergne, **Examinateur**

M. Nicolas BRIDIAU, MCF à l'Université De La Rochelle, **Encadrant scientifique**

M. Thierry MAUGARD, Professeur à l'Université de La Rochelle, **Directeur de thèse**

M. Stanislas BAUDOUIN, Seprosys, **PDG**

Mme Amandine ADRIEN, Seprosys, **Encadrant scientifique**

Contributions scientifiques

Brevets :

- **Bodin J.**, Adrien A., Bridiau N., Maugard T., Dufour D., Baudouin S. Extraits provenant d'*Ulva intestinalis* et d'*Ulva rigida* stimulant la production de collagène par des fibroblastes dermiques humains. France, N° de brevet: 18/57350. 2018.

Publications :

- Adrien, A., Retailleau, J., **Bodin, J.**, Dufour, D., Baudouin, S., Maugard, T., Bridiau, N. Stimulatory effect of protein- and polysaccharide-rich fractions extracted from seaweeds on collagen production by human dermal fibroblasts. **A soumettre**
- **Bodin, J.**; Adrien, A.; Bodet, P.-E.; Dufour, D.; Baudouin, S.; Maugard, T.; Bridiau, N. Ulva intestinalis Protein Extracts Promote In Vitro Collagen and Hyaluronic Acid Production by Human Dermal Fibroblasts. *Molecules* 2020, 25(9), 2091

Communication par poster:

- **Justine Bodin**, Amandine Adrien, Nicolas Bridiau, Jean-Marie Piot, Stéphanie Bordenave-Juchereau, et al. NEURONALG project: development of algal nutritional fraction targeting the inflammation involved in emotional behavior and metabolic disorders. BENEFIQ, Oct 2018, Québec, Canada.
- **Justine Bodin**, Amandine Adrien, Delphine Dufour, Stanislas Baudouin, Thierry Maugard, et al. Anti-aging potential of Ulva intestinalis extract on human dermal fibroblasts in vitro. XXVIème Congrès National de la SFBMEc, May 2019, Reims, France
- **Justine Bodin**, Antoine Bonnet, Pierre-Edouard Bodet, Amandine Adrien, Delphine Dufour, et al. « Structural characterisation of protein/peptide fractions isolated from the green seaweed Ulva intestinalis and in vitro assessment of their anti-aging properties ». Advanced Analytical Technologies for Proteins, Oct 2019, Romainville-Grand Paris, France.

Remerciements

Je souhaite, en premier lieu, remercier la société SEPROSYS, L'Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie, l'Ecole Doctorale Gay Lussac, ainsi que le Laboratoire LIENSs de l'Université de La Rochelle d'avoir financé, encadré et soutenu cette thèse CIFRE.

Mes plus sincères remerciements aux membres du jury qui, par leur expertise, ont examiné ce travail. Je remercie Mme **Rozenn RAVALLEC**, Mme **Véronique PALLET**, Mme **Ingrid ARNAUDIN** et Mr **Guillaume PIERRE** d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse.

Je souhaite remercier Mme **Ingrid ARNAUDIN** et Mr **Olivier DE VIRON**, de m'avoir accueilli dans le laboratoire LIENSs-UMR7266 et d'avoir veillé à la disponibilité des ressources nécessaires à ces travaux.

Je remercie mon directeur de thèse, Mr **Thierry MAUGARD** pour le bon déroulement de ces travaux. Je remercie également, Mr **Nicolas BRIDIAU**, mon encadrant scientifique, pour son implication, sa rigueur scientifique et ses précieux conseils.

Je tiens à remercier particulièrement Mr **Stanislas BAUDOUIN** et Mme **Delphine DUFOUR**, de m'avoir permis d'effectuer cette thèse. Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre confiance. Je remercie l'équipe de **SEPROSYS**, Fanny, Alisson, Joaquim et Christophe, merci pour votre accueil et vos conseils. Je remercie également mon encadrante au sein de l'entreprise, Mme **Amandine ADRIEN**, pour ses conseils et son implication durant ces 3 années.

Je tiens à remercier toute l'équipe du projet **NEURONALG**, l'équipe de NutriNeuro INRA-Université de Bordeaux mais aussi l'équipe de l'INAF-Université de Laval au Québec. Ce fut un plaisir de participer à ce projet et je vous souhaite bonne continuation pour ces travaux.

Je remercie également tout le personnel et les étudiants de l'équipe BCBS pour leur sympathie et leur aide. Merci à **Sabrina SALTAJI** et à **Valérie SOPENA** pour leur gentillesse. Merci à **Pierre-Edouard BODET** pour son aide, son expertise et sa disponibilité. Je remercie vivement tout le personnel administratif du laboratoire LIENSs, **Viviane BIOU** et **Laetitia DARRE**. Je remercie aussi les stagiaires ayant participé de près ou de loin à ces travaux.

C'est avec beaucoup d'affection que je tiens à remercier mes collègues et amis, Claire et Rémi, ma Belette et Rémite, pour votre écoute, pour tous ces fou-rires, ces bières, ces instants potins et pour tout le reste. Ces trois années n'auraient pas eu le même sens sans vous. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Ces travaux sont le résultat de 3 ans de travail et de dévouement de ma part mais également de la part de mes proches, qui m'ont soutenu. Tout d'abord mes amis, Fanny, Bastien, ma Doll, Jadou, Juju et Chouchou. Merci pour tout, pour votre soutien, pour tous ces bons moments passés et surtout pour votre bienveillance.

Un grand merci à ma famille, à ma marraine, à tonton Fredo, à mes oncles et tantes, à mes cousins et cousines et à ma grand-mère. Merci pour votre soutien et votre amour. Merci à ma belle-famille et plus particulièrement à Cécile pour tes corrections. Rafaël a de la chance de t'avoir pour marraine.

Enfin, il existe des personnes sans lesquelles je n'y serais jamais arrivée. Leur amour et leur soutien ont été mon moteur. Je pense, bien sûr avec émotion, à mes parents. Leurs mots et leur tendresse ont été pour moi une force. Ces 3 ans n'ont pas été sans difficultés... Maman, ta force, ta rage de vivre nous ont portés, nous ont aidés à avancer malgré tout... Tu nous as appris à y croire et à attendre patiemment l'éclaircie. J'ai pu à chaque fois me ressourcer auprès de vous. Je vous aime tellement. Merci à mon petit frère, Pierric, pour ton soutien infailible et ton réconfort dans les moments difficiles. Je te souhaite d'être heureux mon petit titou.

Je finirai ces remerciements pour les deux amours de ma vie. D'abord, toi mon amour, je te remercie pour tout, pour tes bras dans les moments difficiles et pour ta force dans les moments où j'en avais besoin. Dieu sait que je n'ai pas toujours été facile, mais j'ai toujours pu compter sur toi et ton amour. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir conseillé et de m'avoir porté. Tu m'as offert le plus beau des cadeaux et de notre amour est né Rafaël. Je suis tellement fière de notre famille. Je t'aime.

Rafaël, j'espère qu'un jour tu liras ces quelques mots. Saches que je suis déjà fière de toi et que tu nous remplis d'amour et de joie. Tu es notre plus belle œuvre et je lève les mains au ciel pour qu'il te guide à travers cette vie qui t'attend. Merci mon petit Popi pour la force que tu m'as donnée pour finir cette thèse, merci pour tes gazouillis et tes sourires. Nous t'aimons tellement.

Finalement, je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ces travaux.

Table des matières

I.	INTRODUCTION GENERALE	15
II.	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	21
II.1	Des macroalgues vertes : <i>Ulva intestinalis</i> et <i>Ulva rigida</i>	23
II.1.1	Les macroalgues marines : Généralités	23
II.1.2	<i>Ulva intestinalis</i> et <i>Ulva rigida</i>	26
II.1.3	Enjeux économiques et applications biologiques	31
II.2	Axe Dermocosmétique : <i>Ulva</i> , remède anti-âge et anti-tâche	39
II.2.1	Histologie	39
II.2.2	Le vieillissement cutané	46
II.2.3	Pigmentation cutanée et éclaircissement cutané	49
II.2.3	Le marché mondial des cosmétiques anti-âge et anti-tâche	57
II.3	Axe Inflammation : <i>Ulva</i> , remède neuroprotecteur	64
II.3.1.	Inflammation et réponse immunitaire	64
II.3.2	Rôle de l'inflammation dans le cas de pathologies du système nerveux central associées aux troubles métaboliques	70
II.3.3	Le potentiel anti-inflammatoire des macroalgues marines	76
III.	MATERIELS ET METHODES	80
III.1	Fournisseurs des macroalgues utilisées	82
III.2	Production des fractions	82
III.2.1	Procédé Seprosys®	82
III.2.2	Dépolymérisation de la fraction polysaccharidique	84
III.2.3	Dépolymérisation enzymatique de la fraction protéique	84
III.3	Caractérisation biochimique et structurale	85
III.3.1	Dosages biochimiques	85
III.3.2	Electrophorèse SDS-PAGE	89
III.3.3	Analyses chromatographique et spectrométrie	90
III.3.4	Fractionnement des hydrolysats par ultrafiltration	96
III.4	Activités biologiques et culture cellulaire	97
III.4.1	Lignées cellulaires	97
III.4.2	Evaluation de l'impact des extraits sur la viabilité cellulaire	97
III.4.3	Détermination de l'activité anti-âge	99
III.4.4	Détermination de l'activité éclaircissante	102
III.4.5	Détermination de l'activité anti-inflammatoire	105
III.5	Modèles murins et tests <i>in vivo</i>	107
III.6	Tests statistiques	110
IV.	RESULTATS ET DISCUSSION	112
IV.1	Procédé de fractionnement et de purification de biomolécules issues de macroalgues marines	114

IV.1.1	Introduction	114
IV.1.2	Amélioration des rendements protéiques et polysaccharidiques du procédé de fractionnement	116
IV.1.3	Caractérisation de la fraction protéique.....	126
IV.1.4	Obtention et caractérisation de fractions protéiques et polysaccharidiques de bas poids moléculaire .	131
IV.2	Fractions provenant de macroalgues vertes, remède anti-âge et anti-tâche.....	149
IV.2.1	Détermination du potentiel anti-âge des fractions algales	150
IV.2.2	Mise en évidence du rôle des protéines dans l'activité anti-âge.....	160
IV.2.3	Détermination du potentiel anti-tâche des fractions algales	167
IV.3	Etude du potentiel anti-inflammatoire de fractions issues d' <i>Ulva</i> sp. en vue de développer un actif ciblant les troubles cognitifs et anxio-dépressifs.....	176
IV.3.1	Effet des fractions algales sur la viabilité cellulaire des macrophages	177
IV.3.2	Effet des fractions algales sur la production de monoxyde d'azote (NO)	178
IV.3.4	Analyses des transcrits pour la mise en évidence du mécanisme d'action	183
IV.3.5	Etudes <i>in vivo</i> d'un effet anti-anxiété et anti-dépresseur des fractions	185
V.	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	193
VI.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	203
IV.	RESUME.....	218

Index des Figures

Figure 1 : Classification des algues vertes, brunes et rouges.....	23
Figure 2 : Thalle, structure de base de l'algue.....	24
Figure 3 : Les trois grandes groupes de macroalgues marines.....	25
Figure 4 : Production mondiale de macroalgues entre 1952 et 2012.....	25
Figure 5 : Photographie d' <i>Ulva rigida</i> , accrochée sur un fond rocheux.....	26
Figure 6 : Photographie d' <i>Ulva intestinalis</i>	27
Figure 7 : Cycle de reproduction chez <i>Ulva</i> sp.....	27
Figure 8 : Composition en différents constituants chez les macroalgues du genre <i>Ulva</i> sp.....	28
Figure 9 : Unités répétitives majoritaires des ulvanes.....	30
Figure 10 : Principaux producteurs de macroalgues FAO- Fisheries and Aquaculture statistics 2016.....	31
Figure 11 : Les principaux domaines d'utilisation à l'échelle mondiale (A) et européenne (B).....	32
Figure 12 : Exemple de différentes activités cosmétiques retrouvées chez les macroalgues marines.....	35
Figure 13 : Différentes activités biologiques connues chez les macroalgues marines.....	36
Figure 14 : Tranche verticale définissant les différentes couches constituant la peau.....	39
Figure 15 : Représentation des différentes couches constituant l'épiderme.....	40
Figure 16 : Photographie microscopique de fibroblastes dermiques humains.....	42
Figure 17 : Liaisons hydrogène entre les trois chaînes polypeptidiques.....	43
Figure 18 : Etapes de formation du collagène.....	43
Figure 19 : Composants cellulaires et extracellulaire contenus dans une peau jeune.....	45
Figure 20 : Principaux facteurs impliqués dans le vieillissement cutané extrinsèque.....	47
Figure 21 : Remodelage de la MEC induit par le vieillissement extrinsèque.....	47
Figure 22 : Les principales causes du vieillissement cutané intrinsèque.....	48
Figure 23 : Remodelage de la MEC induit par le vieillissement intrinsèque.....	49
Figure 24 : Insertion d'un mélanocyte dans l'épiderme.....	50
Figure 25 : Voies de synthèse des différents pigments mélaniques retrouvés dans la peau.....	51
Figure 26 : Régulation de la mélanogénèse par les voies de signalisation principales.....	52
Figure 27 : Structure chimique de l'hydroquinone.....	54
Figure 28 : Structure chimique de l'acide ascorbique.....	55
Figure 29 : Structure chimique de la vitamine B3.....	55
Figure 30 : Structure chimique de l'arbutine.....	55
Figure 31 : Structure chimique de l'acide kojique.....	56
Figure 32 : Exemples de crèmes anti-âge retrouvées sur le marché française.....	58
Figure 33 : Exemples de crèmes anti-âge contenant des extraits de macroalgues marines sur le marché français.....	60
Figure 34 : Exemples de produits anti-tâches commercialisés et contenant des actifs éclaircissants chimiques.....	61
Figure 35 : Exemples de crèmes anti-âge contenant des extraits de macroalgues marines sur le marché français.....	63
Figure 36 : Inducteurs de la réponse inflammatoire.....	64
Figure 37 : Déclenchement et conséquences de la réaction inflammatoire.....	65
Figure 38 : Présentation des médiateurs cellulaires impliqués dans l'inflammation.....	66
Figure 39 : Cytokines pro- et anti-inflammatoire impliquées dans la réaction inflammatoire.....	67
Figure 40 : Récepteur au lipopolysaccharide, le TLR4.....	68
Figure 41 : Les voies de signalisation des récepteurs TLR4.....	69
Figure 42 : La barrière hémato-encéphalique (BHE).....	71
Figure 43 : Voies de reconnaissance induites par la fixation du LPS.....	71
Figure 44 : Système de communication entre le système immunitaire et le système nerveux.....	72
Figure 45 : Distribution des composés neuroprotecteurs identifiés dans des macroalgues entre 1999 et 2015.....	76
Figure 46 : Procédé de fractionnement de biomolécules issues de macroalgues vertes breveté par la société Seprosys.....	78
Figure 47 : Schéma du procédé de fractionnement de biomolécules breveté par la société Seprosys.....	83
Figure 48 : Chromatographe HPLC/RID avec des standards de poids (Pullulan).....	91
Figure 49 : Gamme de calibration en chromatographie gel perméation/UV et standard de poids moléculaire.....	92
Figure 50 : Système Acquity UPLC H-Class couplé au spectromètre de masse Xevo G2 S Q-TOF.....	93
Figure 51 : Schéma récapitulatif de la procédure de fractionnement par ultrafiltration.....	96
Figure 52 : Réaction biochimique de la transformation du MTT en cristaux de formazan (violet).....	98
Figure 53 : Réaction biochimique de la transformation des sels de tetrazolium en cristaux de formazan (violet).....	98

Figure 54 : Protocole illustré du dosage de collagène intracellulaire	100
Figure 55 : Clivage du substrat de la MMP-1	102
Figure 56 : Gamme de concentration de mélanine intracellulaire dans du NaOH 1M contenant 10% de DMSO	103
Figure 57 : Gamme de concentration de mélanine extracellulaire dans du DMEM complet	103
Figure 58 : Principe du test de localisation d'objets contenant trois phases.....	108
Figure 59 : Principe du test du champs ouvert.....	109
Figure 60 : principe du test du labyrinthe en croix surélevée	109
Figure 61 : Procédé breveté d'extraction et de purification fractionnée développé par la société Seprosys.	115
Figure 62 : Etape de broyage de la biomasse algale <i>Ulva rigida</i>	118
Figure 63 : Etape d'extraction de la biomasse algale <i>Ulva rigida</i>	119
Figure 64 : Chromatogrammes UHPLC obtenus après digestion trypsique des fractions PROT1.....	125
Figure 65 : Ensemble des étapes permettant de déterminer la séquence peptidique.....	125
Figure 66 : Profil chromatographique de la fraction PROT1-UI (<i>Ulva intestinalis</i>) à 210 nm.....	127
Figure 67 : Profil chromatographique de la fraction PROT1-UR (<i>Ulva rigida</i>) à 210 nm.....	128
Figure 68 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE présentant le profil protéique de la fraction PROT1-UI	129
Figure 69 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE présentant le profil protéique de la fraction PROT1-UR.....	130
Figure 70 : Compositions en acides aminés libres des fractions PROT1	131
Figure 71 : Etapes successives effectuées afin d'hydrolyser les fractions PROT1-UI et PROT1-UR	133
Figure 72 : Suivi cinétique par HPL-SEC de l'hydrolyse enzymatique de la fraction PROT1-UI.....	134
Figure 73 : Suivi cinétique par électrophorèse SDS-PAGE de l'hydrolyse enzymatique de la fraction PROT1-UI.	135
Figure 74 : Suivi cinétique par HPL-SEC de l'hydrolyse enzymatique de la fraction PROT1-UR.....	136
Figure 75 : Suivi cinétique par électrophorèse SDS-PAGE de l'hydrolyse enzymatique de la fraction PROT1-UR.....	137
Figure 76 : Distribution du PM des protéines et peptides présents dans les fractions PROT1-UI et les hydrolysats	138
Figure 77 : Distribution du PM des protéines et peptides présents dans les fractions PROT1-UR et les hydrolysats....	139
Figure 78 : Différentes étapes conduisant à la production des fractions PROT2-UR <50 kDa et PROT2-UI <50 kDa.	140
Figure 79 : Compositions en acides aminés des peptides séquencés des fractions PROT2-UI et PROT2-UR	143
Figure 80 : Suivi cinétique par HPL-SEC de la dépolymérisation de la fraction PSA-UI.....	145
Figure 81 : Schéma récapitulatif de la production des différentes fractions SEPROSYS	148
Figure 82 : Test de viabilité cellulaire sur les lignées fibroblastiques après contact avec les différentes fractions	151
Figure 83 : Test de mortalité cellulaire sur les lignées fibroblastiques après contact avec les différentes fractions.....	152
Figure 84 : Production de collagène par cellule après 48 h de contact avec les différentes fractions.....	154
Figure 85 : Production d'acide hyaluronique par cellule après 48 h de contact avec les différentes fractions.....	159
Figure 86 : Viabilité cellulaire des lignées fibroblastiques en présence des fractions PROT1 et H-PROT1	161
Figure 87 : Mortalité cellulaire des lignées fibroblastiques en présence des fractions PROT1 et H-PROT1	162
Figure 88 : Production de collagène par cellule après contact avec les fractions PROT1 et H-PROT1	164
Figure 89 : Production d'acide hyaluronique par cellule après contact avec les fractions PROT1 et H-PROT1	165
Figure 90 : Viabilité cellulaire de la lignée mélanocytaire B16F0.....	168
Figure 91 : Production de mélanine intra-cellulaire par la lignée cellulaire B16F0	169
Figure 92 : Morphologie cellulaire des mélanocytes B16F0 après 48 h de culture en présence ou non d' α -MSH.	169
Figure 93 : Sécrétion de mélanine dans le surnageant de culture des mélanocytes B16F0	173
Figure 94 : Schéma récapitulatif des activités dermocosmétiques mises en évidence.....	175
Figure 95 : Structure chimique du fucoïdane et de la dexaméthasone.....	177
Figure 96 : Viabilité cellulaire des macrophages RAW 264.7	178
Figure 97 : Production de monoxyde d'azote dans le surnageant de culture des macrophages RAW 264.7.....	180
Figure 98 : Morphologie des macrophages RAW 264.7 après 12 h de contact sans/avec traitement au LPS	181
Figure 99 : Effets des fractions sur l'expression de gènes codant pour des médiateurs inflammatoires	183
Figure 100 : Vue simplifiée des voies de signalisations induite par le LPS.....	184
Figure 101 : Présentation des différents groupes de souris utilisés pour chaque cohorte.....	186
Figure 102 : Chronologie des différents tests comportementaux effectués sur les différentes cohortes de souris.....	186
Figure 103 : Suivi de la masse corporelle obtenue pour les modèles murins	187
Figure 104 : Cinétique de la glycémie obtenues pour les modèles murins	187
Figure 105 : Aire sous la courbe de cinétique de glycémie postprandiale obtenue lors du test de tolérance au glucose.....	188
Figure 106 : Ratio du temps passé entre l'objet déplacé et l'objet non déplacé lors du test de localisation.....	189
Figure 107 : Temps total de toilettage des modèles murins	189
Figure 108 : Schéma récapitulatif des activités anti-inflammatoires pour les fractions de bas poids moléculaires.....	192

Index des tableaux

Tableau 1 : Composition en acides aminés de macroalgues du genre <i>Ulva</i> sp., <i>Ulva rigida</i> et <i>Ulva intestinalis</i>	29
Tableau 2 : Les macroalgues comestibles au sein de l'Union Européenne et leurs principales utilisations	34
Tableau 3 : Exemple d'activités biologiques de macroalgues (rouge, brune et verte).....	37
Tableau 4 : Principaux glucosaminoglycanes et galactosaminoglycanes retrouvés dans le derme.....	44
Tableau 5 : Exemple de molécules présentant des propriétés éclaircissants.....	56
Tableau 6 : Exemples de molécules algales démontrant des propriétés anti-âges	59
Tableau 7 : Exemple de molécules algales démontrant des propriétés anti-tâches	62
Tableau 8 : Exemple de macroalgues ayant des propriétés anti-inflammatoires connues	77
Tableau 9 : Gradient d'éluion utilisé pour la séparation des fractions par UPLC.....	94
Tableau 10 : Temps de rétention et coefficients de corrélations.	95
Tableau 11 : Couples d'amorces correspondant aux gènes d'intérêts choisis.....	106
Tableau 12 : Teneur en sels et en protéines (Kjeldahl) de la matière première, <i>Ulva intestinalis</i> et <i>Ulva rigida</i>	116
Tableau 13 : Tableau récapitulatif des rendements obtenus pour les fractions PSA-UR et PROT1-UR.	117
Tableau 14 : Compositions biochimiques des différentes fractions d' <i>Ulva rigida</i> (1).....	122
Tableau 15 : Compositions biochimiques des différentes fractions obtenues d' <i>Ulva rigida</i> .(2)	123
Tableau 16 : Compositions biochimiques des différentes fractions provenant d' <i>Ulva intestinalis</i>	124
Tableau 17 : Composition en peptide et en acide aminé de la fraction PROT2-UI	141
Tableau 18 : Composition en peptide et en acide aminé de la fraction PROT2-UR.....	142
Tableau 19 : Composition biochimique des fractions PROT2-UR <50 kDa et PROT2-UI <50 kDa.....	144
Tableau 20 : Composition biochimique et caractérisation structurale des fractions polysaccharidiques.....	146
Tableau 21 : Pourcentages d'inhibition de la MMP-1 des différentes fractions.	157
Tableau 22 : Pourcentages d'inhibition de la tyrosinase de champignon des différentes fractions	174

Liste des abréviations et des unités

Abréviations :

ADN	Acide désoxyribonucléique
α -MSH	Alpha-melanocyte-stimulating hormone
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AG	Acide gras
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique
AP-1	Protéine activatrice 1
COX-2	Cyclooxygénase-2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
DHEA	Déhydroépiandrostérone
ECM	Extracellular matrix
EMEM	Eagle's Modified essential Medium
ERK	Extracellular-signal-regulated kinases
FAO	Food and Administration organization of the United Nations
GAG	Glycosaminoglycanes
HA	Hyaluronan or Hyaluronic acid
HPLC	High pressure liquid chromatography
IMC	Indice de masse corporel
IFN	Interféron
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
IL-1 β	Interleukine 1 β
IL-6	Interleukine 6
L-DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MMP	Matrix metalloproteinase
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
MW	Molecular Weight
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PBS	Phosphate buffered saline
UV	Ultraviolet
TGF- β	Transforming growth factor β
TGF- α	Transforming growth factor α
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TYR	Tyrosinase
ROS	Reactive oxygen specie

Unités :

%	Pourcentage
BV	Base volume
°C	Degré Celsius
Da	Dalton
h	Heure
g	Gramme
l	Litre
M	Mole
min	Minute
rpm	Rotation par minutes
s	Seconde

I. Introduction Générale

Cette thèse CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche) a été réalisée au sein de l'équipe **BCBS** (**B**iotechnologies et **C**himie des **B**ioressources pour la **S**anté) de l'UMR 7266 CNRS-LIENSs de La Rochelle Université et de l'entreprise SEPROSYS, située à La Rochelle.

L'environnement marin est un écosystème présentant une grande biodiversité. Parmi les nombreux organismes marins, on retrouve les algues et plus particulièrement les macroalgues faisant preuve d'une incroyable richesse. De nouvelles espèces de macroalgues sont identifiées quotidiennement mais elles ne représentent que 17% des 200 000 espèces existantes (Radmer. 1996). Utilisées depuis des millénaires, les macroalgues marines possèdent de hautes valeurs nutritives. En effet, elles présentent une fraction minérale variée et abondante, des protéines en quantités non négligeables et bien équilibrées en acides aminés essentiels, une fraction lipidique faible mais riche en acides gras polyinsaturés et en fibres ayant des structures diverses (Fleurence. 1993; 1999). Cette diversité en biomolécules d'intérêts leur confère un nombre certain d'activités biologiques telles que des activités antioxydantes, antibactériennes, antivirales, anti-inflammatoires, anticoagulantes ou encore anti-âge (Ariede et *al.* 2017; Pangestuti et *al.* 2011; Hamed et *al.* 2015; Adrien et *al.* 2017; 2019). Ces activités biologiques permettent leur utilisation dans de nombreux domaines tels que les domaines pharmaceutique, cosmétique ou nutraceutique (Faller et *al.* 2011).

C'est dans ce contexte que la société SEPROSYS (Séparations, Procédés, Systèmes) a développé et breveté, en 2011, un procédé de séparation et de purification fractionnée de biomolécules issues de macroalgues de type *Ulva* sp. (Baudouin et *al.* 2012). L'objectif de cette société spécialisée dans le développement de solutions d'extraction, de séparation et de purification de molécules d'intérêts est de valoriser **une biomasse locale et peu exploitée**, via un procédé de fractionnement innovant **éco-compatible** en ne faisant pas intervenir de solvant ou d'acide. Ce procédé facilement **transposable à l'échelle industrielle et économiquement viable** a fait l'objet d'une première thèse.

Lors de cette précédente thèse, menée par le **Dr Amandine Adrien**, la fraction polysaccharidique provenant d'*Ulva rigida* a pu être caractérisée, dépolymérisée et valorisée dans le domaine de la dermo-cosmétique (activité anti-âge) et dans le domaine de la pharmaceutique (activité anti-coagulante) et de premiers résultats ont pu montrer l'activité pro-collagène de la fraction protéique d'*Ulva intestinalis* (Adrien et *al.* 2017; Adrien et *al.* 2019). De plus, ces travaux ont permis de montrer qu'il existait différents verrous importants (rendements faibles et pureté à améliorer) à lever sur le procédé d'extraction et de purification SEPROSYS®. La société SEPROSYS et l'équipe BCBS du laboratoire LIENSs ont, pour cette raison, élaboré un nouveau projet de thèse ayant pour objectifs de résoudre ces différents verrous, mais aussi de passer le procédé d'extraction à plus grande échelle (une dizaine de kg) et de valoriser les autres fractions du procédé issues d'*Ulva intestinalis* (**UI**) et d'*Ulva rigida* (**UR**) par l'étude de leurs activités biologiques potentielles (Adrien. 2016). Ces deux **biomasses locales** sont produites par des algoculteurs sur l'île d'Oléron (la ferme du Douhet) et sur l'île de Ré (Algorythme).

Afin d'identifier des applications potentiellement commercialisables pour les différentes fractions de macroalgues marines extraites et purifiées selon le procédé développé par la société SEPROSYS, il est intéressant de cibler des activités appartenant aux domaines de la nutraceutique et de la dermocosmétique pour lesquels les molécules sont à **valeur ajoutée moyenne** et où **le risque économique est plus faible** et le retour sur investissement plus rapide que dans le domaine pharmaceutique, ce afin de pérenniser et valoriser le procédé.

Une étude réalisée sur **le marché dermocosmétique** montre que celui-ci générera, d'ici **2025**, un chiffre d'affaires de l'ordre de **638 milliards d'euros** (source Grand View Research 2019). De même, **l'industrie nutraceutique** est estimée à **184 milliards de dollars**, et est en constante évolution. Le chiffre d'affaires attendu en **2022** est de 302 milliards de dollars (Santini et al. 2018). Il s'agit donc aussi d'un secteur à haut potentiel et en constante évolution. La forte croissance de ces marchés et la demande grandissante des consommateurs pour des produits dits « verts » et sans produits chimiques permet d'identifier des applications potentiellement commercialisables pour les différentes fractions provenant d'*Ulva rigida* et d'*Ulva intestinalis* extraites selon le procédé développé par la société SEPROSYS. Ces travaux s'articulent donc en trois grandes parties :

- La première partie présenter les différents travaux concernant l'**amélioration du procédé**, la **caractérisation** des fractions protéiques et polysaccharidiques ainsi que la **production** de fractions peptidiques et oligosaccharidiques provenant d'*Ulva rigida* et *Ulva intestinalis*.
- La deuxième partie est consacrée à l'évaluation du potentiel « **anti-âge** » et du potentiel « **anti-tâche** » des différentes fractions provenant d'*Ulva rigida* et *Ulva intestinalis*. Dans ce but, nous avons étudié dans un premier temps l'impact des différentes fractions sur la viabilité cellulaire et la production de collagène et d'acide hyaluronique de deux lignées fibroblastiques : une lignée fibroblastique CDD-1059 provenant d'une femme donneuse âgée de 20 ans et une autre lignée fibroblastique CDD-1090 provenant d'une femme donneuse âgée de 46 ans. Par la suite a été étudié l'effet des fractions sur l'activité de la tyrosinase et sur la production *in vitro* de mélanine par des mélanocytes murins B16F0, très utilisés pour le criblage de composés anti-tâche.
- La troisième partie s'intègre au sein d'un projet dénommé **Neuronalg**, dont l'objectif est le **développement d'actifs nutritionnels algo-sourcés**, ciblant l'inflammation et les mécanismes d'altérations du comportement émotionnel liés aux troubles métaboliques. Afin de répondre au mieux à cette problématique, ont été criblées *in vitro* les activités anti-inflammatoire des fractions produites sur des macrophages murins RAW264.7 à travers la mesure de médiateurs clés de voies de signalisation de la réaction inflammatoire, comme la quantification de monoxyde d'azote produit, associée au niveau transcription de protéines cibles comme iNOS (NO synthase inductible) et de cytokines pro- et anti-inflammatoires.

Ces travaux de thèse sont déclinés dans ce manuscrit en **quatre chapitres**.

- 1) Le **chapitre 1** constitue une étude bibliographique regroupant les connaissances générales sur les macroalgues marines. Et plus précisément sur deux macroalgues : *Ulva intestinalis* et *Ulva rigida*. Par la suite, sont particulièrement décrits l'histologie de la peau, le vieillissement cutané, et les molécules algales démontrant un intérêt pour des applications « anti-âge ». Les principales connaissances sur la mélanogenèse, ainsi que les molécules extraites de macroalgues ayant démontré un intérêt pour des applications « anti-tâche » sont abordées. Pour finir, l'inflammation et les mécanismes d'altération du comportement émotionnel lié aux troubles métaboliques sont décrits, et les molécules extraites de macroalgues démontrant un intérêt pour des applications anti-inflammatoires sont présentées.
- 2) Le **chapitre 2** s'attache à regrouper le l'ensemble des matériel et méthodologies employés lors de ces travaux de thèse.
- 3) Au sein du **chapitre 3**, les résultats obtenus pour les activités « anti-âge » et « anti-tâche » des différentes fractions provenant d'*Ulva rigida* et d'*Ulva intestinalis* sont évalués et discutés.
- 4) Pour finir, au sein du **chapitre 4**, est étudié le potentiel de lutte contre la neuro-inflammation et les troubles cognitifs et de l'humeur qui y sont associés de certaines fractions provenant d'*Ulva rigida* et d'*Ulva intestinalis*.

II. Etude Bibliographique

II.1 Des macroalgues vertes : *Ulva intestinalis* et *Ulva rigida*

II.1.1 Les macroalgues marines : Généralités

Les premières algues, apparues il y a environ 2 milliards d'années, seraient le fruit d'une symbiose entre des bactéries photosynthétiques et des cellules eucaryotes (Raven et *al.* 2007). On les retrouve sous différentes formes allant de l'échelle microscopique et unicellulaire (les microalgues) à l'échelle macroscopique pour des algues atteignant plusieurs mètres (les macroalgues). Il existe entre 20 000 et 30 000 espèces d'algues différentes à la surface du globe, représentant 18% du règne végétal (Garon-Lardière. 2004). Les algues forment un vaste ensemble hétérogène d'embranchements distincts et sont présentes dans plusieurs lignées indépendantes (*figure 1*).

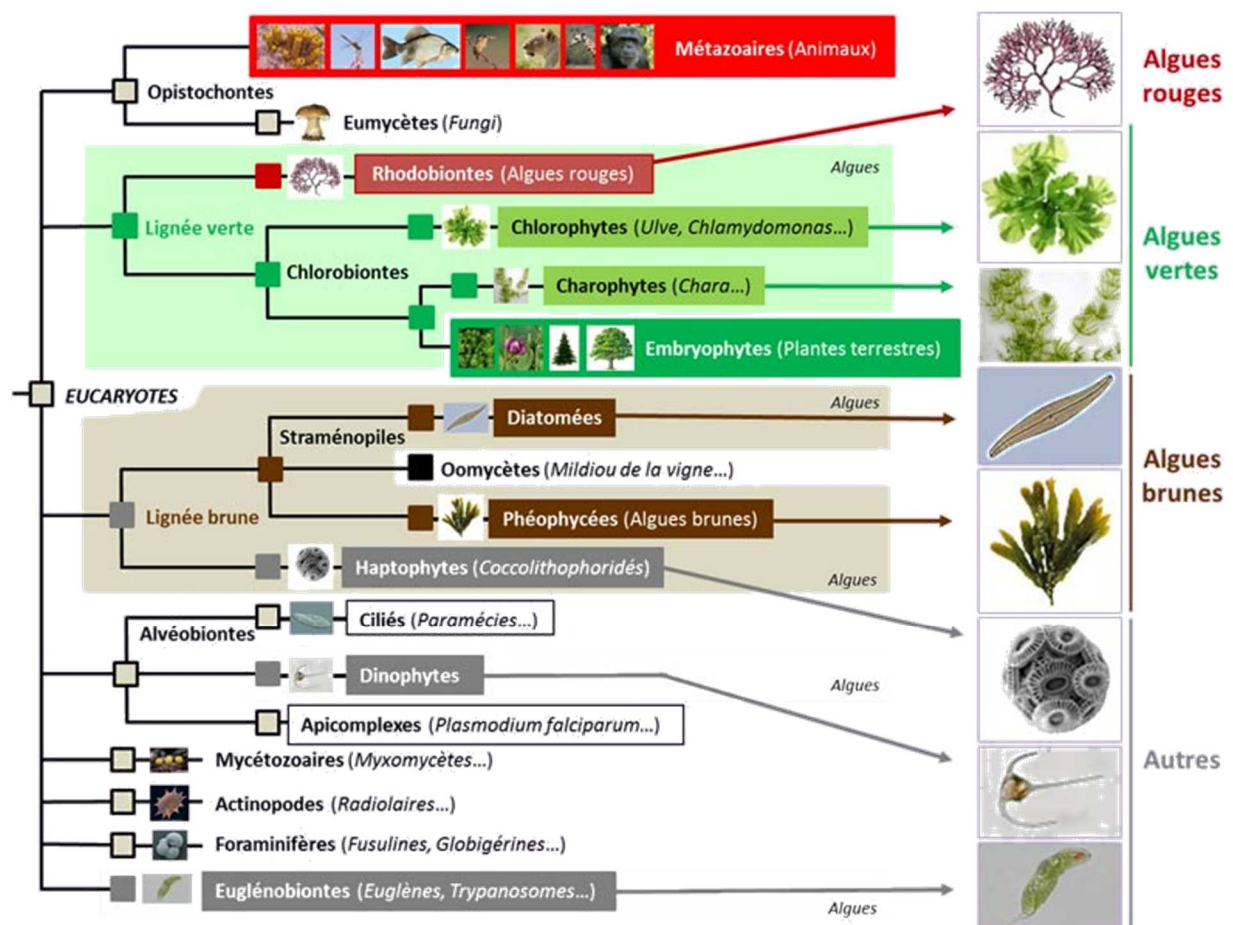


Figure 1 : Classification et répartition des divers groupes d'algues eucaryotes (algues vertes, brunes et rouges), au sens large, dans l'arbre phylogénétique (<https://www.encyclopedie-environnement.org/zoom/les-algues-et-leur-classification/>)

On retrouve tout d'abord les macroalgues de la **lignée verte**. Elle se compose des **algues rouges** (*Rhodobiontes* ou *Rhodophycées*) uniquement aquatiques et plutôt marines, et des algues vertes (*Chlorobiontes*) réparties en deux lignées parallèles : lignée des *Chlorophytes* et la lignée des *Streptophytes*. Ensuite, on retrouve la **lignée brune** assez éloignée de la lignée verte. On retrouve différentes lignées en parallèle : les *Haptophytes*, unicellulaires et marines, les *Phéophycées* ou algues brunes au sens strict (surtout marines) et les **Diatomées** (microscopiques).

Les macroalgues sont des organismes aquatiques pluricellulaires. Ce sont des végétaux photosynthétiques, la lumière leur est donc indispensable. Ces végétaux photosynthétiques sont composés d'un appareil végétatif appelé thalle (*Figure 2*). Le thalle contient une base (crampons, ...) permettant l'ancrage de l'algue sur un support. Le thalle présente une grande diversité de formes allant de lames simples à des structures plus complexes semblables à des tubes, des tiges ou des feuilles. La partie haute du thalle des macroalgues, appelée fronde, peut être sous forme de filaments, cordons ou lanières. Les macroalgues possèdent également des textures très variées : certaines algues sont gélifiées, d'autres sont cartilagineuses ou spongieuses. Par ailleurs, certaines algues présentent un thalle très rigide, suite à l'accumulation de carbonate de calcium ou aragonite dans les parois de leurs cellules (Garon-Lardièrre. 2004).

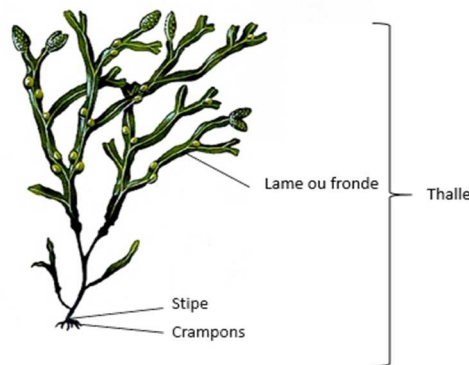


Figure 2 : Thalle, structure de base de l'algue.

Le thalle est composé de 3 grands éléments : la lame, le stipe et les crampons

Les macroalgues peuvent peupler des écosystèmes aquatiques tels que des océans, des lacs, des rivières et même des glaciers, ainsi que des systèmes terrestres y compris les roches et des sols sableux (Floch et *al.* 2019). Elles se répartissent verticalement dans l'eau à des profondeurs différentes, de 0 à 100 mètres, en fonction de leur besoin en lumière. Leur répartition dépend de divers facteurs tels que la lumière, la salinité, le type de sol, la houle ou encore l'alternance d'émersion et d'immersion. Elles possèdent une paroi cellulaire partiellement cellulosique, des noyaux cellulaires et des plastes pigmentés comportant de la chlorophylle et des pigments donnant la couleur de l'algue (Garon-Lardièrre. 2004).

Les macroalgues sont classées en quatre grands groupes. On distingue des **algues vertes** (chlorophycées), des **algues brunes** (xanthophycées), des **algues rouges** (phéophycées) ou encore des cyanobactéries (antérieurement dénommées « algues bleues »). Trois types de

pigments donnent leurs pigmentations aux algues : les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobiliprotéines (Kützing, 1843). Chaque groupe d'algues possède une couleur bien définie due à une signature pigmentaire particulière. Cette signature pigmentaire a été utilisée comme critère de classification (*figure 3*).

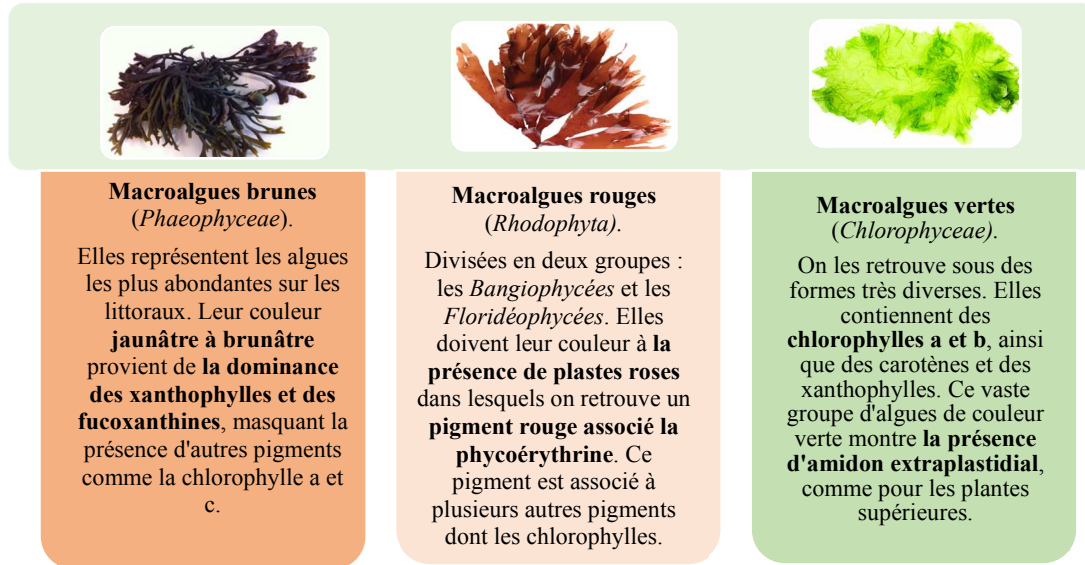


Figure 3 : Les trois grands groupes de macroalgues marines classées en fonction de leur composition pigmentaire.

De façon générale, les macroalgues rouges et brunes sont plus utilisées que les macroalgues vertes (*figure 4*). En effet, la grande majorité de la demande mondiale concerne les macroalgues rouges et brunes pour l'utilisation de colloïdes, même si ces dernières années de nombreuses sociétés de biotechnologies s'intéressent à la valorisation de celles-ci.

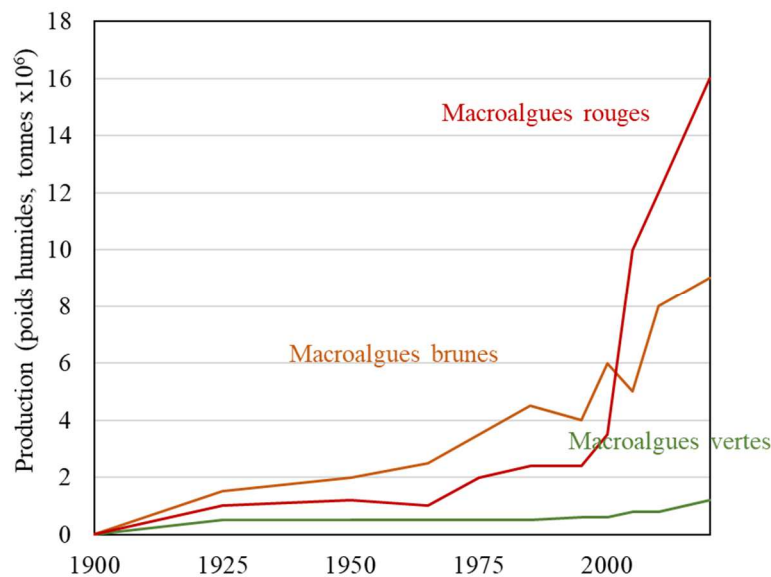


Figure 4 : Production mondiale (culture et collecte) de macroalgues marines entre 1952 et 2020 (Tiwari et al. 2015)

II.1.2 *Ulva intestinalis* et *Ulva rigida*

Les Ulves sont des macroalgues vertes de la famille des *Ulvaceae*. Le genre *Ulva* est ubiquitaire et se trouve dans tous les océans du globe terrestre. Leur thalle peut être sous forme de lame (ex : *Ulva rotundata*, *Ulva armoricana*) ou en tube filamenteux (ex : *Ulva compressa* ou *Ulva intestinalis*). Elles peuvent être de différentes tailles. Lors de cette étude, nous allons particulièrement nous intéresser à deux espèces : *Ulva rigida* et *Ulva intestinalis*.

II.1.2.1 Caractéristiques et répartition géographique

a. *Ulva rigida*

Ulva rigida est une macroalgue verte du genre *Ulva*, (*Ulvaceae*), de l'ordre des *Ulvales*, la classe des *Ulvophyceae* incluse dans la division *Chlorophyta* (figure 5). Présentant des thalles très minces de couleur verte clair et translucide, *Ulva rigida* peut se retrouver sous forme de touffes ou de lames solitaires. Leur taille varie de 30 à 40 cm mais peut atteindre 1 mètre. *Ulva rigida* peut se fixer sur des roches et se retrouve en abondance dans les zones peu profondes et illuminées. Elle se développe aussi dans les zones de ruissellement riches en éléments nutritifs, même polluées. Sa distribution est commune et elle est largement présente dans le monde (« *Ulva rigida* | DORIS » 2019.).

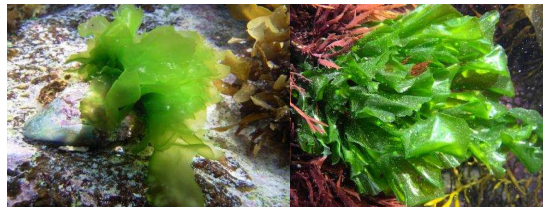


Figure 5: Photographie d'*Ulva rigida*, accrochée sur un fond rocheux (Photographs © M.D. Guiry)

b. *Ulva intestinalis*

Ulva Enteromorpha var. *Intestinalis* est une macroalgue verte ubiquitaire du genre *Ulva*, (*Ulvaceae*), de l'ordre des *Ulvales*, la classe des *Ulvophyceae* incluse dans la division *Chlorophyta*, présentant des thalles en forme de tube très fins (figure 6). La lame est plissée et change de couleur passant du vert foncé au vert clair voire vert jaunâtre. *Ulva intestinalis* pousse sur des fonds rocheux de la surface à de faibles profondeurs (Prud'homme van Reine et al. 2001; Ruangchuay et al. 2007).



Figure 6 : Photographie d'*Ulva intestinalis* (Photographs © Per Arvid Åsen, Photographs © Judith Bush)

c. Mode de reproduction

Le cycle de reproduction atteint son apogée au printemps et en été, *Ulva* sp. enchaîne une alternance de deux générations (Pettett. 2009). On distingue en premier lieu une reproduction asexuée qui consiste en la division du thalle. Cette division génère des sporophytes identiques marqués par une diploïdie (*figure 7*). Par la suite, on distingue la production de zoospores donnant naissance à des gamétophytes mâles et femelles (Pettett. 2009). Les signaux environnementaux tels que la luminosité, la température, le pH, la salinité, la disponibilité des nutriments et la déshydratation vont jouer sur le cycle de reproduction.

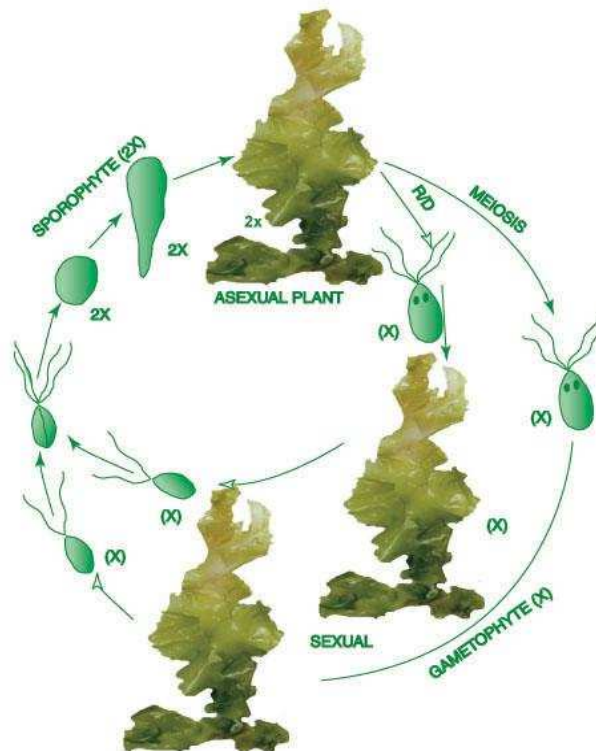


Figure 7: Cycle de reproduction chez *Ulva* (<http://www.niobioinformatics.in>)

II.1.2.2 Les polymères présents chez *Ulva rigida* et *Ulva intestinalis*

Il est rapporté qu'*Ulva rigida* contient entre 76% et 83% d'eau localisée dans les vacuoles, la paroi cellulaire et le cytoplasme (Ak et al. 2015). On retrouve également des polysaccharides, des protéines, des lipides, de pigments, des vitamines et minéraux en proportions variables (figure 8).

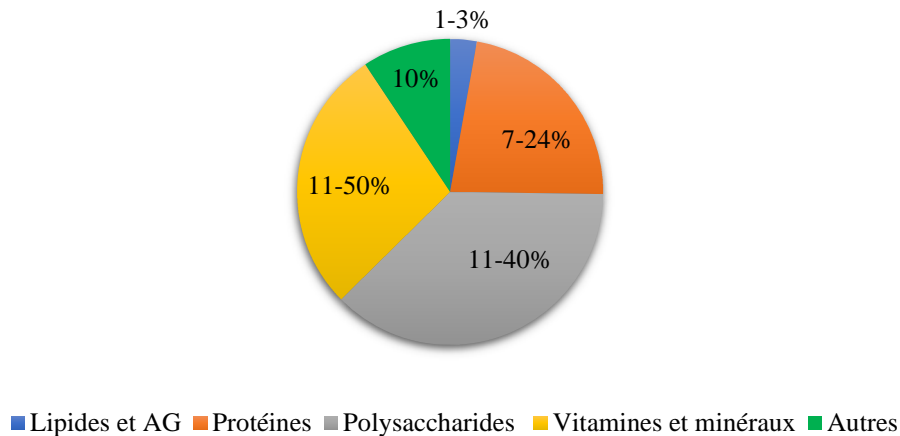


Figure 8 : Composition moyenne en différents constituants (lipides, acides gras, protéines, polysaccharides, vitamines et minéraux) chez les macroalgues du genre *Ulva* sp.

La diversité des biomolécules présentes chez *Ulva* sp. permet l'adaptation à des habitats complexes et varie en fonction de différents paramètres tels que la distribution géographique, les saisons ou encore à des facteurs environnementaux comme la température de l'eau, la salinité, la lumière, les nutriments et les minéraux disponibles (Messyasz et al. 2011).

a. Protéines et peptides

Le teneur en protéines chez les macroalgues du genre *Ulva* sp. est de l'ordre de 7-24% (matière sèche/poids sec) (Ortiz et al. 2006; Kazir et al. 2019). Cette teneur peut varier considérablement d'une étude à une autre. Par exemple, *Ulva rigida* a montré des taux de protéines variant en fonction des saisonnalités (entre 11,3% et 23,6%) (Rouxel et al. 2001). La teneur la plus élevée est atteinte en décembre alors qu'une autre étude montre des teneurs en protéines plus élevées entre février et mai avec une valeur moyenne de 4 % (Ivanova et al. 2013). De façon générale, toutes les espèces du genre *Ulva* vont subir des variations de la teneur en protéines en fonction des saisons (Pádua et al. 2004; Shuuluka et al. 2013).

Les macroalgues possèdent une composition en acides aminés assez intéressante. En effet, une étude a comparé la composition en acides aminés de macroalgues avec celle d'aliments tels que les œufs, et il en ressort que leur composition en acides aminés essentiels sont de même ordre (Fleurence. 1999). La composition en acides aminés et leur teneur respective chez *Ulva rigida* et *Ulva intestinalis* sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1: Composition en acides aminés de macroalgue du genre *Ulva* sp., *Ulva rigida* et *Ulva intestinalis* exprimée en pourcentage par rapport au poids sec de l'algue

Acides aminés	<i>Ulva</i> sp.	<i>Ulva rigida</i>	<i>Ulva intestinalis</i>
Alanine	8.6 ± 0.74	13.54	1.92
Arginine	23.03 ± 1.92	5.06	1.86
Acide aspartique	16.11 ± 1.37	14.31	2.58
Cystéine	x	1.21	x
Acide Glutamique	12 ± 1.41	10.35	1.65
Glycine	2.11 ± 1.08	8.59	1.43
Histidine	0.64 ± 0.04	1.54	2.07
Isoleucine	3.6 ± 0.4	3.4	1.25
Leucine	4.31 ± 0.73	5.72	1.76
Lysine	6.34 ± 1.16	4.07	0.66
Méthionine	0.81 ± 0.21	1.65	2.29
Phénylalanine	2.06 ± 0.68	3.6	0.89
Proline	3.32 ± 0.52	4.7	2.99
Serine	6.93 ± 0.46	6.7	1.54
Thréonine	4.35 ± 0.51	5.50	1.11
Tyrosine	2.88 ± 0.41	2.42	2.41
Valine	2.92 ± 1.22	6.16	2.22
Référence	(Kazir et al. 2019)	(Shuuluka et al. 2013)	(Lewis et al. 1960)

b. Polysaccharides et fibres alimentaires

Les macroalgues sont caractérisées par un pourcentage élevé de polysaccharides. La composition et la teneur en polysaccharides va varier en fonction des différentes espèces de macroalgues vertes mais aussi en fonction des conditions et des paramètres de culture. La grande majorité des polysaccharides sont des hétéropolysaccharides. En effet, ils sont constitués d'unités qui se répètent et qui présentent au moins deux résidus différents. Ils peuvent également contenir différents substituants liés par des liaisons éthers, esters, amides, sulfates ou acétaliques. On retrouve, en moyenne, 22% de polysaccharides chez *Ulva rigida* et entre 35-40% chez *Ulva intestinalis* (Peasura et al. 2015). Plus précisément, on distingue les polysaccharides de réserve et les polysaccharides pariétaux.

Les polysaccharides de réserve résultent de la photosynthèse et sont stockés dans les vacuoles cellulaires. Chez les macroalgues vertes, on retrouve de l'amidon et du glucane (polymère de 1,4-β-glucose).

Les polysaccharides pariétaux constituent la paroi des algues (McNeil et al. 1984). Ils se subdivisent en deux parties : *les polysaccharides de la phase matricielle* et *les polysaccharides de la phase fibrillaire*. La phase fibrillaire est constituée de polysaccharides solubles enrobés de mucilage (Kloareg et al. 1988). Chez les macroalgues vertes, la phase fibrillaire est constituée de cellulose (polymère de (1,4)-β-glucopyranose), de xylanes (polymères linéaires composés de β-(1,4)-D-xylose) et de mannanes (polymères linéaires composés de β-(1,4)-D-mannose.). La phase matricielle est constituée d'un mucilage contenant de l'eau, des protéines et des polysaccharides hydrosolubles. Chez les macroalgues vertes du genre *Ulva*, on retrouve les **ulvanes**. Ces ulvanes sont composés de rhamnose (16-45%), d'acides iduronique et glucuronique (6-20%), de xylose (2-13%) et de glucose (0,5-9%)

(Lahaye et al. 1996). L'unité disaccharidique répétée majoritaire des ulvanes est de type acide ulvanobiuronic 3-sulfaté contenant soit de l'acide glucuronique (type A), soit de l'acide iduronic (type B) comme représenté figure 9.

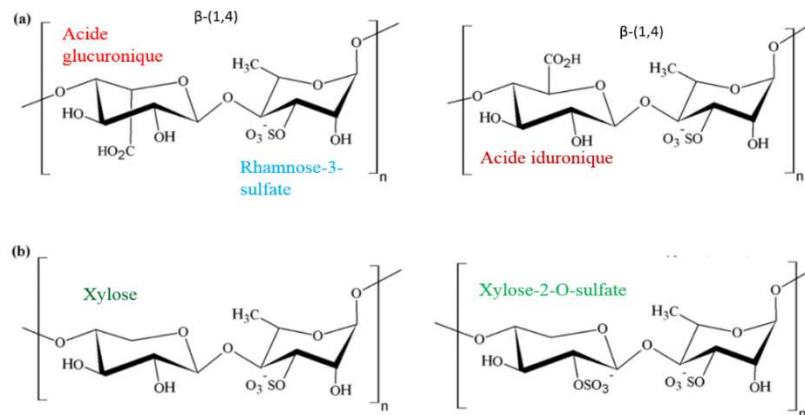


Figure 9 : (a) Unités répétitives majoritaires des ulvanes $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcAp-(1,4)-}\alpha\text{-L-Rhap3S-(1}\rightarrow\text{)]}_n$ et $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-IdoAp-(1,4)-}\alpha\text{-L-Rhap3S-(1}\rightarrow\text{)]}_n$, (b) Variation de structure de l'unité disaccharidique (ulvanobiiose-3-sulfate de type A et ulvanobiiose-2,3-disulfate de type B) (Adrien et al. 2017)

c. Lipides et acides gras

Les macroalgues sont riches en acides gras polyinsaturés tels que les acides oméga 3 et oméga 6. Le contenu en acides gras est très faible (9 g.kg^{-1}) chez *Ulva* sp. D'après la littérature, le contenu total en lipides chez *Ulva rigida* varie selon les études, allant de 0,79 à 12% (Ivanova et al. 2013; Faller et al. 2011). Les taux d'acides gras saturés chez *Ulva* varient de 32 % à 47%. Dans la plupart des cas, on y retrouve en majorité de l'acide palmitique (C16:0), de l'acide béhénique (C22:0) et de l'acide stéarique (C18:0). On retrouve aussi des acides gras mono-insaturés tels que l'acide oléique (C18:1) et l'acide palmitoléique (C16:1) (Kim. 1996). Cependant, cette teneur en acides gras varie aussi selon l'espèce, l'habitat, la lumière, la salinité, la pollution et les conditions environnementales (Ilknur et al. 2015).

d. Vitamines et sels minéraux

Les macroalgues *Ulva* sp. contiennent des vitamines du groupe B (B1, B2 et B12) (Hamed et al. 2015). Néanmoins, la vitamine A est la plus abondante, bien que la vitamine E, la vitamine B et la vitamine C soient présentes en grandes quantités également (Taboada et al. 2010). Ces macroalgues sont aussi très riches en minéraux essentiels et en oligo-éléments tels que le calcium, le sodium, le potassium et le magnésium (Hamed et al. 2015). Par exemple, la teneur en cendre chez *Ulva rigida* varie entre 11 et 35% en fonction des études (Ilknur et al. 2015). Au cours du temps, les macroalgues se sont adaptées à différents environnements plus ou moins rudes en produisant des composés et des métabolites secondaires pour leur défense chimique. Ces composés sont utilisés dans des domaines d'applications variable grâce à leur intérêt nutritionnel valorisable.

II.1.3 Enjeux économiques et applications biologiques

II.1.3.1 Production d'algues dans le monde et en France

La production mondiale de macroalgues marines s'élève à près de 30 millions de tonnes en 2016 (CEVA. (2016). Accès. www.ceva-algues.com/secteurs-dactivite/aquaculture-sourcing-culture-en-mer-a-terre/2016) et cette production ne cesse d'augmenter. Les macroalgues marines vont être cultivées à travers le monde suivant différentes techniques (milieu ouvert ou fermé, sporulation contrôlée, culture sur filière, sur radeau, ou au sol) (Mesnildrey et al. 2012). Les macroalgues marines retrouvées sur le marché mondial proviennent de culture en milieu ouvert ou fermé mais aussi de récolte sur les estrans (macroalgues marines sauvages). Les principaux producteurs sont la Chine, l'Indonésie et les Philippines qui comptabilisent à eux seuls environ 90% de la production mondiale (figure 10).

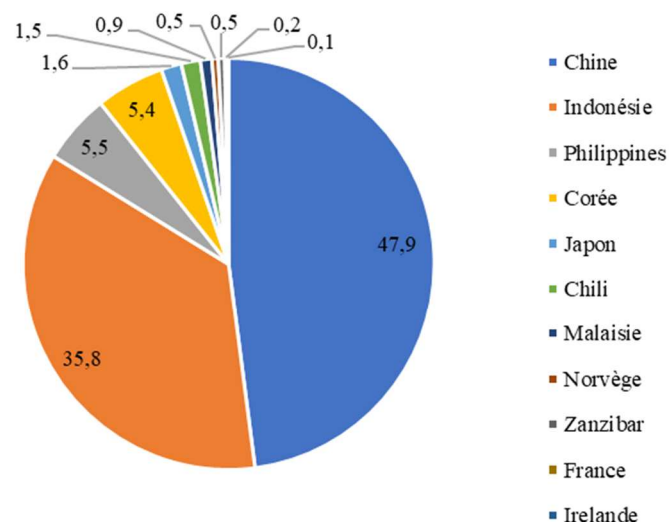


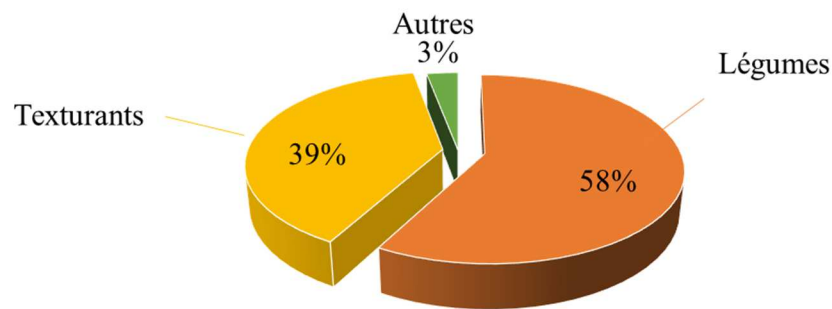
Figure 10 : Principaux producteurs de macroalgues FAO- Fisheries and Aquaculture statistics 2016 (Données 2014)

La France, elle, est le dixième producteur mondial et le deuxième pays producteur d'algues à l'échelle européenne. Dans les pays occidentaux, la production d'algues en Europe en 2013 était de 350 000 tonnes (Maguire. 2015). La quasi-totalité vont être produit à partir de la cueillette d'algues sauvages et la culture dans des fermes aquacoles françaises est estimée à 50 tonnes avec essentiellement deux algues : *Undaria pinnatifida* et *Saccharina latissima* (Mesnildrey et al. 2012). Une étude menée par Reydet et al (2011) a permis d'estimer la proportion de récoltant à pieds : 50 récoltants professionnels et 500 récoltants occasionnels.

En France, il existe quelques sites de culture situés majoritairement en Bretagne mais aussi en Charente-Maritime (Algorithme sur l'île de Ré et la Ferme aquacole du Douhet sur l'île d'Oléron). Cette production va considérablement augmenter dans les futures années, grâce au lancement de plusieurs entreprises dans l'algoculture. Actuellement, en France, treize espèces sont autorisées par les autorités sanitaires pour la consommation : *Ascophyllum nodosum*, *Chondrus crispus*, *Fucus vesiculosus et serratus*, *Gracilaria verrucosa*, *Himantalia elongata*, *Lithothamnion*, *Laminaria digitata*, *Saccharina latissima et japonica*, *Undaria pinnatifida*, *Palmaria palmata*, *Porphyra* sp., *Ulva* sp., *Enteromorpha* sp.

A l'échelle mondiale, les macroalgues sont principalement utilisées comme légumes, c'est-à-dire directement, sans transformation, lors d'un repas (figure 11.A). Par opposition, en Europe, la tendance est différente, puisque 94% des algues françaises sont utilisées et transformées pour l'agro-alimentaire (figure 11.B). Elles vont être utilisées dans l'industrie agro-alimentaire, la chimie et la microbiologie. À mesure que leur culture et leurs utilisations augmentent, leur valeur sur le marché augmente également. On estime qu'en 2024, cette valeur dépassera le double de celle atteinte en 2017, atteignant 9,25 milliards d'euros (Leandro et al. 2020).

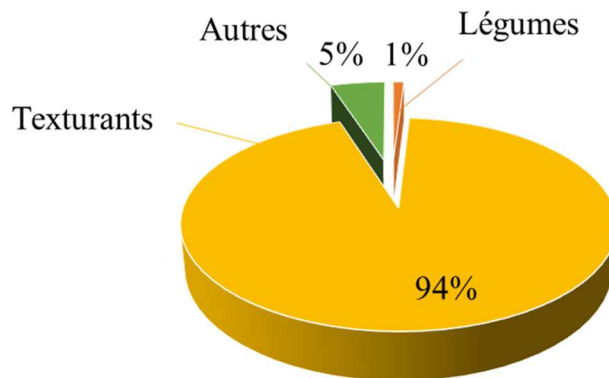
A.



Utilisation à l'échelle mondiale

CEVA, 2016

B.



Utilisation à l'échelle européenne

CEVA, 2016

Figure 11 : Les principaux domaines d'utilisation à l'échelle mondiale (A) et européenne (B) (légumes, texturants, autres (cosmétique, agriculture, ...)) des macroalgues marines (culture et récolte). (<https://www.ceva-algues.com/secteurs-dactivite/aquaculture-sourcing-culture-en-mer-a-terre/2016>)

II.1.3.2 Principales utilisations des macroalgues marines

De nombreuses propriétés sont appliquées aux macroalgues et ce grâce à leur richesse moléculaire. Actuellement, les macroalgues peuvent être considérées comme une ressource alternative pour une biomasse durable et rentable (cultivées relativement rapidement et à grande échelle) destinée à de nombreuses applications. L'utilisation de macroalgues a suscité une attention grandissante ces dernières années, notamment dans les domaines de l'alimentation, de la médecine, des cosmétiques, de l'aquaculture et de l'horticulture.

- **Nutrition Humaine et industries agro-alimentaires :**

Les macroalgues marines sont utilisées directement comme source d'alimentation par de nombreux pays et notamment par les populations asiatiques (Gérard. 2016). Cette consommation semble prendre de plus en plus d'ampleur dans les pays occidentaux en raison de leur intérêt nutritionnel dans le cadre d'une alimentation saine et biologique (Chouikhi et al. 2013). On retrouve de très nombreuses gammes de produits alimentaires à base d'algues, en particulier dans les magasins biologiques. Il est possible de citer des marques tels que Bord-à-bord[®], Marinoé[®] ou encore depuis l'été 2018 la marque BJORG[®]. Le tableau 2 présente **différentes macroalgues comestibles** pouvant être achetées dans les supermarchés sous forme de feuilles sèches (*Tableau 2*). Ces macroalgues vont posséder des intérêts différents et vont être consommées sous différentes formes. Les macroalgues sont aussi utilisées de façon indirecte dans l'industrie alimentaire. On les retrouve en tant qu'agent de texture dans l'industrie des phycocolloïdes grâce à leurs propriétés rhéologiques (épaississant, stabilisant, gélifiant, etc.) (Leandro et al. 2020). Les phycocolloïdes tels que l'agar-agar, les carraghénanes et les acides alginiques sont largement utilisés dans plusieurs industries alimentaires. Ils possèdent des propriétés gélifiantes, épaississantes et stabilisantes utilisées principalement dans les produits laitiers ou à base de viande. Ils représentent près de 40% des colloïdes produits dans le monde, soit un marché de près de 585 millions de dollars (Vauchel. 2007).

Tableau 2: Les macroalgues comestibles au sein de l'Union Européenne et leurs principales utilisations (D'après Tremblin, 2016)

Espèces	Noms Communs	Classe	Intérêts	Consommation
<i>Chondrus crispus</i>	Lichen de mer, Mousse d'Irlande	Rhodophycées	Gélifiant (carraghénanes)	Extrait aux propriétés gélifiantes
<i>Palmaria palmata</i>	Dulse	Rhodophycées	Riche en magnésium	En salade crue ou cuite
<i>Porphyra sp.</i>	Porphyre, Laitue pourpre, Nori	Rhodophycées	Riche en protéines et en vitamines	Sous forme de maki
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Ogonori	Rhodophycées	Source d'agar	Extrait aux propriétés gélifiantes
<i>Lithothamnium calcareum</i>	Mäerl	Rhodophycées	Complément alimentaire riche en carbonates et en minéraux	En gélules
<i>Himantalia elongata</i>	Haricote ou spaghetti de mer	Phéophycées	Riche en fibres et en minéraux	Cuite comme un légume
<i>Undaria pinnatifida</i>	Wakamé	Phéophycées	Détoxifiant grâce aux alginates	Crue en salade ou cuite dans les soupes
<i>Laminaria sp.</i>	Laminaire sucrée, Kombu, Kombu royal	Phéophycées	Très riche en iode	Elément de base de soupe japonaise. Extrait aux propriétés gélifiantes
<i>Fucus vesiculosus</i>	Varech vésiculeux	Phéophycées	Riche en fibres et en alginates	Légume mais surtout farine pour le bétail
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Goémon noir	Phéophycées	Riche en minéraux, iode et en alginate	Légume mais surtout farine pour le bétail
<i>Ulva intestinalis</i>	Aonori, Cheveux de mer, Nori vert	Chlorophycées	Riche en fer	Hachée pour parfumer salades ou omelettes
<i>Ulva lactuca</i>	Laitue de mer	Chlorophycées	Riche en vitamine C	En salade

• **Cosmétiques :**

L'industrie cosmétique a un chiffre d'affaires annuel estimé à 170 milliards de dollars US (Arora et al. 2012). Différentes projections montrent que l'industrie cosmétique continuera à se développer dans de nombreux pays occidentaux. L'un des domaines d'intérêt est une plus grande utilisation d'ingrédients naturels et écologiquement durables pour répondre aux demandes des clients. Les macroalgues vont donc être un excellent ingrédient bioactif pour la préparation de produits cosmétiques. Des extraits de macroalgues sont déjà commercialisés et présentent des activités dermo-cosmétiques variées (figure 12).

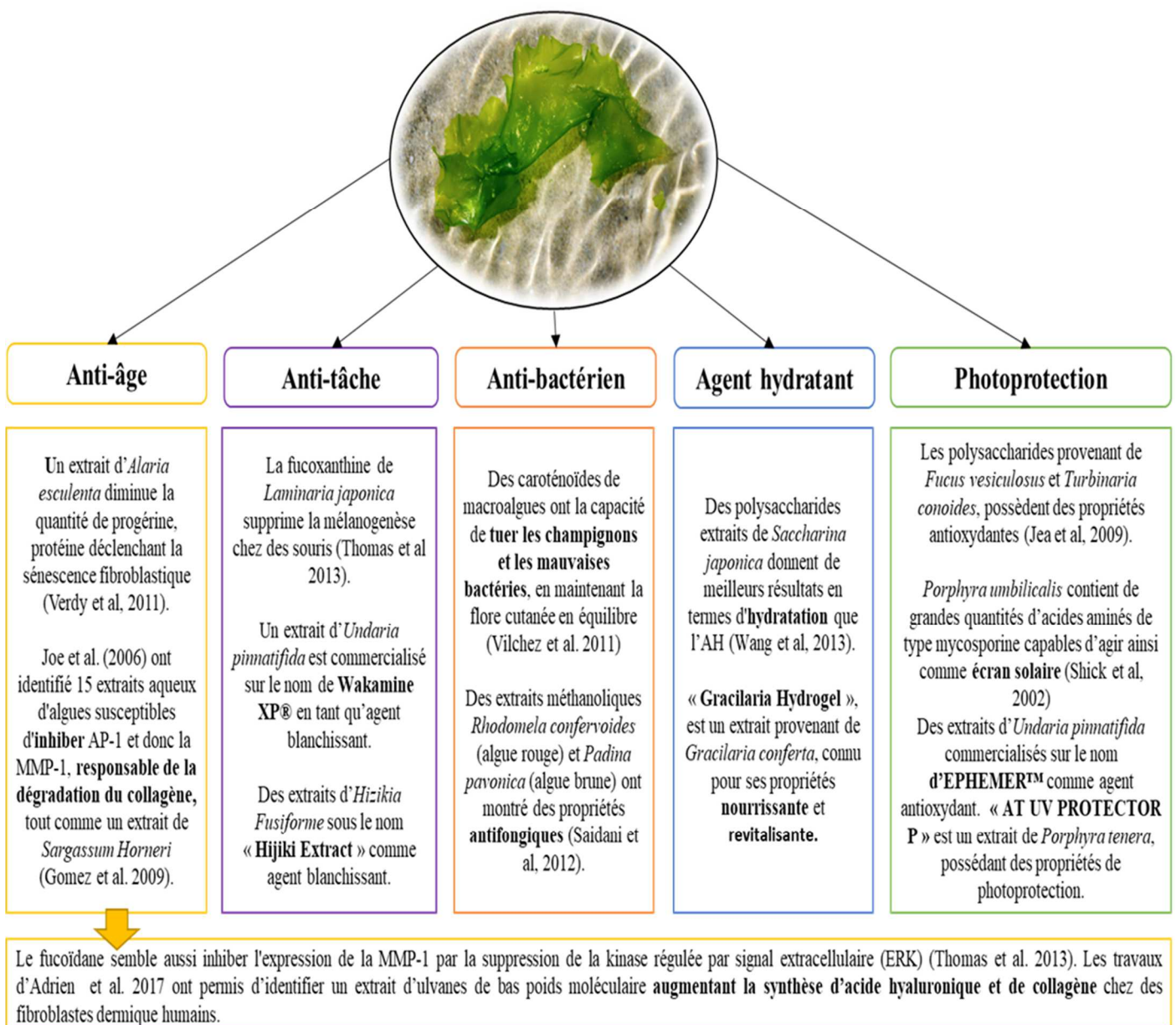


Figure 12: Exemple de différentes activités cosmétiques (anti-âge, anti-tâche, anti-bactérien, hydratation ou photoprotection) retrouvées chez les macroalgues marines

On retrouve des extraits de macroalgues marines dans des produits cosmétiques plus atypiques comme XYLISHINE™, un extrait de *Pelvetia canaliculata*, aux **propriétés nourrissantes pour les cheveux**, ou encore Akomarine® Fucus, une formulation cosmétique **anticellulite et amincissante**.

• **Application pharmaceutique et nutraceutique :**

Les marchés des produits pharmaceutiques et nutraceutiques sont en pleine croissance et attirent particulièrement les consommateurs. Une part croissante de la recherche pharmaceutique et nutraceutique se concentre sur la production de composés bioactifs à partir de macroalgues (figure 13).

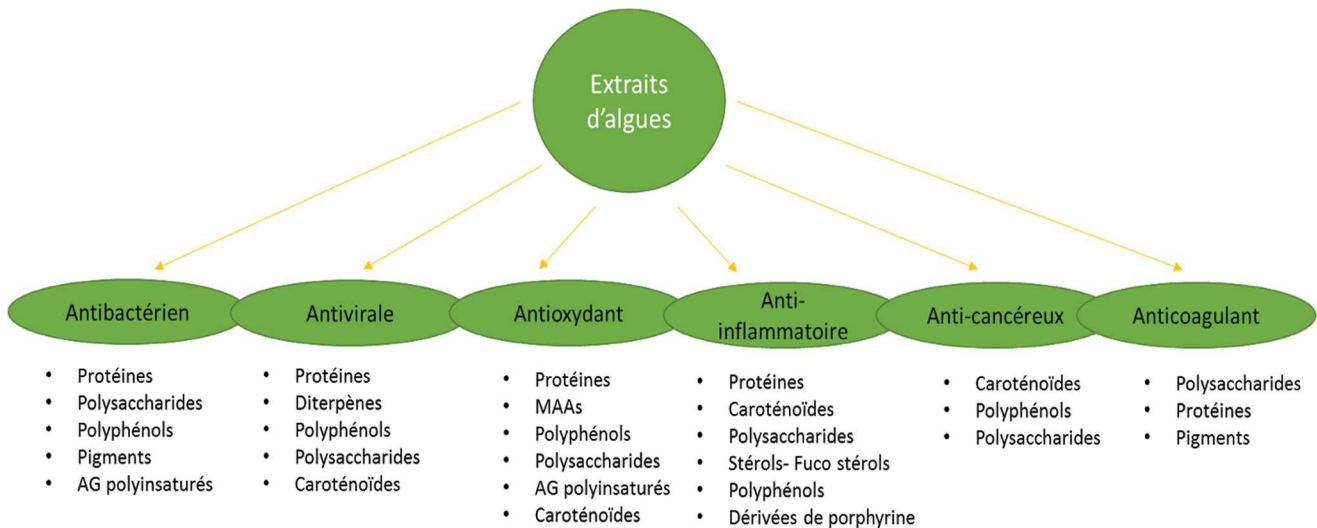


Figure 13 : Différentes activités biologiques (anti-bactérien, antivirale, antioxydant, anti-inflammatoire, anti-cancéreux et anti-coagulant) connues et démontrés dans la littérature chez les macroalgues marines.

Les macroalgues marines possèdent donc un nombre considérable de bioactivité déjà connue (tableau 3). On retrouve des activités antioxydantes, antivirale, antitumorale, anti-inflammatoire, ou anti-coagulante.

• **Environnement :**

- **Nutrition animale et santé végétale :**

Les macroalgues ont plusieurs utilisations en pisciculture et gagnent du terrain en tant que systèmes d'aquaculture intégrés (Largo et al. 2016). Les fermes d'algues marines agissent comme des puits de nutriments et augmentent la productivité primaire, agissent comme habitat pour certains poissons et crustacés (Buck. 2017). Les macroalgues vont aussi posséder de nombreux avantages pour des applications dans le domaine agricole (Chouikhi. 2013). Par

exemple, *Fucus vesiculosus* peut être utilisé en tant qu'additifs alimentaires, transformées sous forme de farines mélangées à la nourriture, pour leurs qualités digestives (Arzel. 1987).

Tableau 3 : Exemple d'activités biologiques (antioxydante, antivirale, antitumorale, anti-inflammatoire, anti-coagulant) de macroalgues marines (rouge, brune et verte).

Macroalgues	Molécules	Activité	Référence
Activité antioxydante			
<i>Sargassum siliquastrum</i>	Extrait méthanolique, composés phénolique	Protection des globules rouges contre l'hémolyse et puissante inhibition de la peroxydation lipidique du cerveau de rat	(Lim et al. 2002)
<i>Fucus vesiculosus</i>	Composés phénoliques	Activité antioxydante sur des macrophages RAW 264.7 activés	(Zaragoza et al. 2008)
<i>Undaria pinnatifida</i>	Hydrolysats enzymatiques (protéases et glucosidases)	Diminution de l'activité des radicaux DPPH et des radicaux hydroxyles	(Je et al. 2009)
<i>Alaria crassifolia</i>	Composés phénolique et fucoxanthine	Diminution de l'activité des radicaux DPPH et ABTS	(Airanthi et al. 2011)
<i>Cystoseira compressa</i>	Polysaccharides	Chélation des ions ferreux, réduction des ions ferriques et piégeage des radicaux DPPH	(Hentati et al. 2018)
<i>Solieria chordalis</i>	Fractions lipidiques	Diminution de l'activité des radicaux DPPH	(Terme et al. 2018)
<i>Sargassum muticum</i>	Fractions lipidiques	Diminution de l'activité des radicaux DPPH	(Terme et al. 2018)
Activité antivirale			
<i>Undaria pinnatifida</i>	Polysaccharides sulfatés (galactofurane)	Inhibition de la liaison virale et de l'entrée dans la cellule hôte	(Thompson et al. 2004)
Macroalgue rouge	Polysaccharides sulfatés (carraghénane)	Gel microbicide vaginal. Inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI) MIV-150 (PC-817).	(Spieler. 2002)
<i>Ecklonia cava</i> , <i>Ishige okamurae</i> , <i>Sargassum confusum</i>	Extraits méthanoliques	Inhibe l'activité de transformation en 3' du VIH-1-intégrase	(Ahn et al. 2002)
Activité antitumorale			
<i>Bryopsis</i> sp.	Peptides	Inhibition de croissance et de multiplication cellulaire sur les cellules P-388 et les cellules A549 du cancer du poumon humain	(Ma et al. 2006)
<i>Adenocystis utricularis</i> , <i>Curdiea racovitzae</i> , <i>Georgiella confluens</i>	Acides gras	Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses MCF-7 et MDA-MB-231	(Pacheco et al. 2018)
<i>Sargassum coreanum</i>	Polysaccharides	Induit apoptose chez des cellules HL-60 (leucémie)	(Ko et al. 2013)
<i>Sargassum polycystum</i>	Fucoïdanes	Effet anti-prolifératif de la lignée MCF-7 (cancer du sein)	(Palanisamy et al. 2017)
<i>Laminaria japonica</i>	Phlorotannins	Effet anti-prolifératif de la lignée BEL- 7420 (hépatocarcinome)	(Yang et al. 2010)
Activité anti-inflammatoire			
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Acides gras	Inhibe la production de médiateurs inflammatoires en régulant à la baisse l'activité NF-κB et STAT1 chez des RAW 264.7	(Lee et al. 2009)
<i>Eisenia bicyclis</i>	Phlorotannins	Inhibe l'expression de la NO synthase et de la COX-2	(Jung et al. 2013)
<i>Saccharina japonica</i>	Dérivés de porphyrine	Inhibe la production de médiateurs inflammatoires en régulant à la baisse l'activité NF-κB	(Islam et al. 2013)
Activité anti-coagulant			
<i>Codium fragile</i> , <i>Sargassum horneri</i>	Polysaccharide	Temps de thromboplastine partielle activée élevé (APTT)	(Athukorala et al. 2007)
<i>E. menziesii</i> , <i>U. neumatoidea</i> , <i>P. perforant</i>	Extraits méthanoliques	Indice APTT et indice PT élevés.	(Guerra-Rivas et al. 2011)
<i>Fucus vesiculosus</i>	Fucoïdanes	Forte activité antithrombine	(Cumashi et al. 2007)
<i>Laminaria digitata</i> , <i>Fucus vesiculosus</i> , <i>Chondrus crispus</i>	Fractions polysaccharidiques sulfatés	Capacité anticoagulante APTT significative, seulement 5 fois inférieure à celle de Lovenox®	(Adrien et al. 2017)
<i>Ulva rigida</i>	Ulvanes chimiquement sulfatés	Temps de prothrombine, thrombine et d'APTT élevés.	(Adrien et al. 2019)
Autres activités			
<i>Gracilaria corticata</i>	Extraits méthanoliques	Augmentation de la perte pré-implantatoire chez des rats femelles du jour 1 au jour 7 de la gestation	(Ratnasooriya et al. 1994)

Elles peuvent aussi stimuler le système immunitaire de certains animaux. Dans le cadre d'un partenariat de recherches entre le groupe Olmix et l'INRA, un extrait de polysaccharide sulfatés provenant d'*Ulva armoricana* a été étudié *in vitro* pour tester sa capacité à inhiber la croissance des bactéries pathogènes isolées d'animaux d'élevage et stimuler la production de médiateurs de l'immunité dans un système *in vitro* de cellules épithéliales intestinales porcines (Berri et al. 2017).

Les macroalgues peuvent aussi jouer un rôle dans le domaine de la santé végétale. En effet, elles peuvent être utilisées directement en épandage pour apporter des sels minéraux (Perez. 1997) et jouer le rôle de bioengrais en permettant de maintenir l'eau dans le sol et de l'enrichir le sol en minéraux (Cu, Co, Zn, Mn, Fe, N). En fournissant ces éléments essentiels, les épandages de macroalgues améliorent la germination et augmentent les rendements en assurant, en outre, une défense contre des gastéropodes (Perez. 1997).

- Biocarburant :

La production d'énergie à partir de macroalgue peut être classée en deux catégories en fonction de la nécessité de sécher la biomasse avant transformation. La production de biocarburants à partir de biomasse d'algues sèches implique soit une combustion directe, une pyrolyse, une gazéification ou une transestérification (Milledge et al. 2014). Les biocarburants algaux présentent des avantages par rapport aux carburants d'origine terrestre, tels qu'un contenu énergétique supérieur et une croissance rapide (Yanagisawa et al. 2013), mais aussi peu de concurrence avec l'utilisation des terres agricoles destinées à l'alimentation.

- Bioremédiation :

Les macroalgues peuvent être utilisées comme agents de biorestauration pour traiter les eaux usées. Elles possèdent la capacité d'accumuler et d'éliminer les composés toxiques tels que les métaux lourds et même les agents pathogènes. Elles peuvent être utilisées au sein d'un procédé de lagunage, participant à un processus de biodégradation (Cohen et al. 1991). Ce traitement biologique est donc une nouvelle application très intéressante, déjà utilisée dans certaines stations d'épurations.

Les macroalgues peuvent être aussi utilisées en tant que bioindicateurs de la qualité du milieu. En effet, elles peuvent accumuler des composés toxiques tels que les métaux lourds (Melville et al. 2007). Leurs compositions chimiques peuvent donc fournir des informations sur les sources de pollution et leurs niveaux. C'est le cas *Ulva rigida* qui possède de fortes capacités de bioaccumulation des métaux lourds (Boubonari et al. 2008). Comme vu précédemment les macroalgues sont utilisées dans de nombreuses applications, allant de la santé à l'agriculture.

II.2 Axe Dermocosmétique : *Ulva*, remède anti-âge et anti-tâche

La peau forme une barrière physique contre les agressions extérieures. Elle protège les organes des agents infectieux, des chocs, des rayons solaires et des substances toxiques. La peau est le plus grand organe du corps humain, représentant 1,2 à 2,3 m² pour environ 5 kg (Mélissopoulos. 2012). La peau est un organe perméable, la diffusion d'une substance à travers celle-ci peut donc être simple (la substance passe toute seule pour équilibrer sa concentration de part et d'autre), facilitée par des enzymes, ou activée par des pompes spécifiques (comme la pompe sodium-potassium). Elle permet également à l'organisme d'avoir une sensibilité à la pression, à la chaleur et à la douleur (Mélissopoulos. 2012). La peau est en perpétuel renouvellement et sa connaissance est primordiale pour une action cosmétique.

II.2.1 Histologie

La peau est composée de **quatre couches** portant des caractéristiques particulières (Démarchez. 2015). De la surface vers la profondeur, on retrouve, de la couche externe à la couche interne : **l'épiderme, la jonction dermo-épidermique, le derme et l'hypoderme** (figure 14).

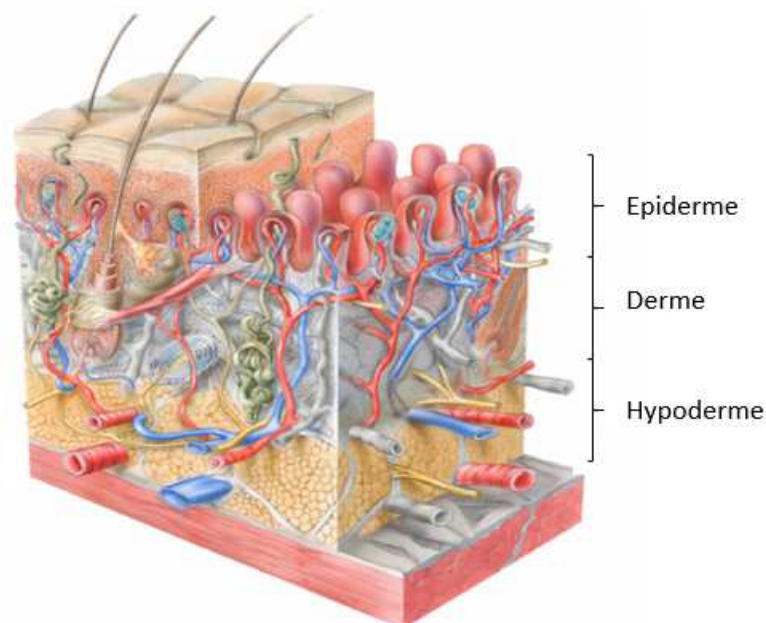


Figure 14: Tranche verticale définissant les différentes couches constituant la peau (Delalleau. 2007)

II.2.1.1 L'épiderme

L'épiderme est un épithélium de revêtement. Cette couche est non vascularisée mais innervée. En moyenne, l'épaisseur est de 0,1 mm.

Les **kératinocytes** représentent la population cellulaire majoritaire de l'épiderme (85%), les 15% restant se répartissant entre les autres types cellulaires, en particulier les mélanocytes (responsables de la couleur de la peau) et les cellules de Langerhans (qui jouent un rôle dans les mécanismes immunitaires). Les kératinocytes vont se multiplier et se différencier tout au long de l'épiderme afin de devenir des cornéocytes. Les kératinocytes ont trois fonctions : la cohésion de l'épiderme, la fonction de barrière entre les milieux extérieur et intérieur et la protection contre les rayons lumineux (Démarchez. 2015).

L'épiderme est organisé **en quatre couches** (figure 15). Ces couches sont constituées de kératinocytes et sont empilées les unes sur les autres qui sont de bas en haut la **couche basale**, la **couche épineuse**, la **couche granuleuse** et la **couche cornée** (Démarchez. 2015; Fuchs. 2008).

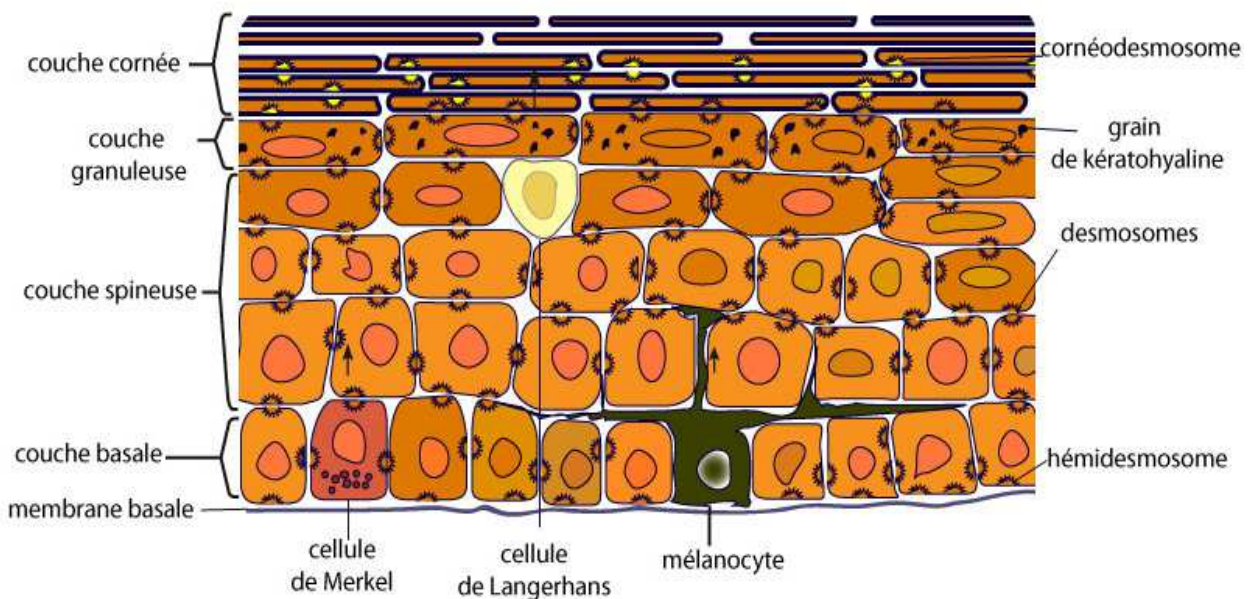


Figure 15 : Représentation des différentes couches constituant l'épiderme. On retrouve la couche cornée, la couche granuleuse, la couche épineuse, la couche basale et la membrane basale (biologiedelapeau.fr)

Au sein de l'épiderme, on retrouve aussi les **mélanocytes**. Ces cellules étoilées dites « dendritiques » vont s'intercaler entre les kératinocytes des couches basales et épineuses (Gillbro et al. 2011). Autre type cellulaire retrouvé dans l'épiderme, il existe les **cellules de Langerhans**. Elles possèdent un corps cellulaire dendritique et ce sont des cellules dites « mobiles » qui vont pouvoir se déplacer dans le derme. Ces cellules de Langerhans sont

capables d'orienter la réponse immunitaire (Prost-squarcioni et *al.* 2006). En effet, elles vont présenter les antigènes détectés aux lymphocytes T.

On rencontre également **les cellules de Merkel**, de façon irrégulière, dans la couche basale. Les cellules de Merkel sont des cellules sensibles, qui enregistrent les stimuli vibratoires du toucher qu'elles transmettent aux terminaisons nerveuses (Van Keymeulen et *al.* 2009).

II.2.1.2 La jonction dermo-épidermique

Synthétisée par les kératinocytes et les fibroblastes dermique, la jonction dermo-épidermique sépare le derme de l'épiderme. Elle permet de fournir une résistance aux contraintes externes mais aussi un support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme.

Il est possible de distinguer quatre zones allant de l'épiderme au derme : **la membrane plasmique** représentant la couche basale de l'épiderme, **la lamina lucida** traversée par des filaments d'ancrage riches en laminine, **la lamina densa** majoritairement constituée de collagène de type IV mais également de laminines et de protéoglycanes et **la zone fibrillaire** comprenant des fibres d'ancrages. Les fibres d'ancrage sont constituées de collagène de type VII et permettent l'ancrage au derme. La jonction dermo-épidermique joue un rôle de barrière sélective permettant le contrôle des échanges moléculaires et cellulaires entre les deux compartiments et possédant un rôle fondamental dans la cicatrisation cutanée (Mélissopoulos. 2012).

II.2.1.3 Le derme

Le derme est constitué d'un tissu conjonctif soutenant l'épiderme. Il se compose d'une matrice extracellulaire abondante et dense, de fibroblastes et de cellules sanguines auxquelles sont associés des fibres de collagène, de réticuline et d'élastine formant un ensemble compact (Prost-squarcioni et *al.* 2008). Les **fibroblastes** sont les cellules les plus abondantes du derme. Il est également constitué de **cellules dendritiques dermiques**, de **mastocytes** et de **macrophages**.

Les fibroblastes, cellules fusiformes, fournissent la structure de base du derme (*figure 16*). La fonction principale des fibroblastes est **de produire ou de dégrader les composants de la matrice extracellulaire** (Pesteil et *al.* 2017). Ils sécrètent du collagène, de l'élastine, de la fibrilline mais aussi des facteurs de croissance et des enzymes, dont des collagénases et des inhibiteurs de protéases matricielles, permettant de dégrader la matrice extracellulaire (Pesteil et *al.* 2017). Les fibroblastes sont donc acteurs du renouvellement et de la réorganisation de la matrice extracellulaire. Les fibroblastes coopèrent avec les kératinocytes pour organiser la jonction dermo-épidermique et jouent un rôle majeur dans les interactions dermo-épidermique (Marionnet et *al.* 2006).

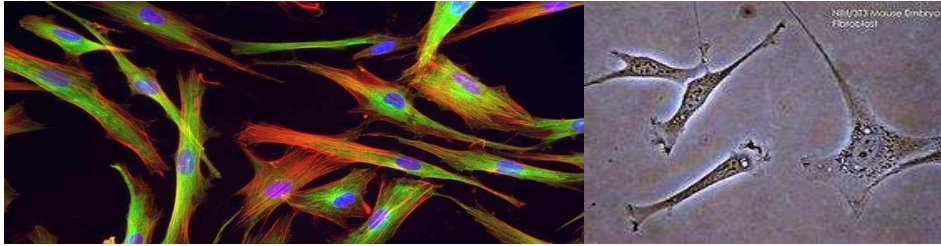


Figure 16 : Photographie microscopique de fibroblastes dermiques humains (Tsnena (2007)).

Les macrophages sont des cellules mobiles possédant un rôle de défense lors de l'intrusion d'un corps étranger dans la peau. Ils assurent des fonctions de phagocytose et de présentation de l'antigène. Ils synthétisent un très grand nombre d'enzymes et sont capables de sécréter diverses cytokines inflammatoires. Par ailleurs, ils interviennent dans les phénomènes de réparation et de cicatrisation (Prost-squarcioni et *al.* 2008).

Les cellules dermiques dendritiques forment, grâce à leurs dendrites, un vaste réseau aux mailles très serrées. Elles vont pouvoir capturer les antigènes et migrer vers les ganglions lymphatiques afin de présenter l'antigène aux lymphocytes T et B (Bouloc. 2001).

Les mastocytes sont des cellules granuleuses. Connues pour leur rôle dans le déclenchement des urticaires, elles sont capables de signaler un danger par la libération d'histamine. Ces différents types cellulaires vont évoluer dans un réseau complexe et organisé appelé « **la matrice extracellulaire** ». La grande diversité de la matrice extracellulaire est liée au grand nombre de molécules qui la composent. Ces macromolécules peuvent se regrouper en trois grands types (Ruggiero et *al.* 2005) :

- des **protéines fibreuses** très volumineuses : **les collagènes** et **l'élastine**
- des **glycoprotéines** telles que la fibronectine ou la laminine qui jouent un rôle dans l'adhésion cellulaire ;
- des **glycosaminoglycanes** constituant un gel hydraté de remplissage de la matrice en piégeant de l'eau, par exemple, **l'acide hyaluronique**.

Les **fibres de collagène** sont les protéines les plus abondantes du règne animal. Ce sont des protéines fibreuses insolubles. Le collagène est synthétisé par différents types cellulaires dont les fibroblastes du derme. Il existe une douzaine de collagènes : I, II, III, IV, V, VI, VII... (Malhotra et *al.* 2015). Ces collagènes sont regroupés en sept catégories. Le collagène de **type I** représente 60 à 80% des collagènes du derme et de l'hypoderme, le collagène de **type III** compte pour 15 à 25% et le collagène de **type V** pour 2 à 5%. Le collagène est d'abord synthétisé sous forme de **procollagène**, ce dernier étant ensuite transporté dans le réticulum

endoplasmique où il subit des modifications pour maturer en différents types de collagène (Ricard-Blum *et al.* 2005).

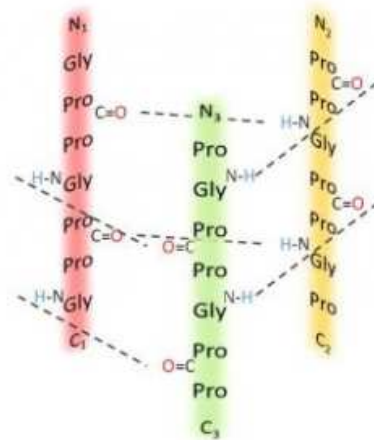


Figure 17 : Liaisons hydrogène (lignes pointillées) entre les trois chaînes polypeptidiques, composées du motif Pro-Pro-Gly, d'une triple hélice de collagène. (<http://iramis cea.fr/>)

Ces différentes modifications permettent d'aboutir au **tropocollagène**. Cette glycoprotéine est formée de trois chaînes polypeptidiques appelées « chaînes α » (Ricard-Blum *et al.* 2005). Cette triple hélice mesure 300 nm de long sur 1,5 nm de diamètre, porte des résidus glucidiques (glucose, galactose), et est superenroulée en hélice droite. Chaque chaîne polypeptidique est constituée d'environ 1000 acides aminés formant une séquence répétitive Gly-X-Y, où X, représentant la proline et Y l'hydroxyproline, un acide aminé caractéristique du collagène (*figure 17*). L'enroulement des trois chaînes α est assuré par des liaisons hydrogène entre la glycine et l'hydroxyproline (Mouw *et al.* 2014) (*figure 18*).

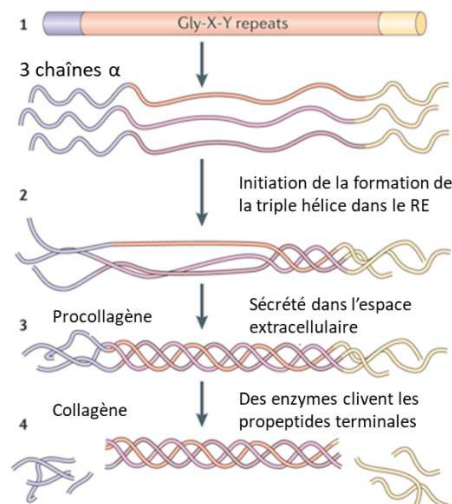


Figure 18: Description des différentes étapes de la formation des fibres de collagène (Mouw *et al.* 2014)

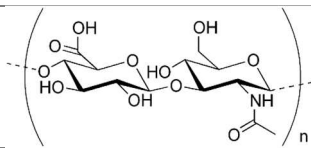
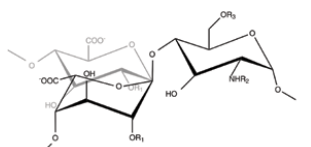
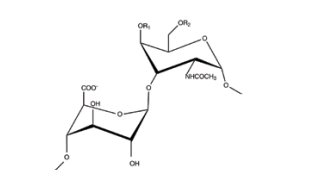
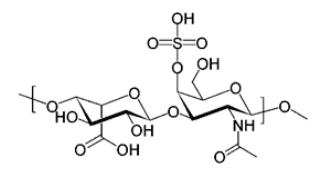
La deuxième catégorie de protéines fibreuses retrouvée dans le derme est l'élastine. Les **fibres élastiques** sont constituées d'élastine associée à des éléments microfibrillaires (Hornebeck *et al.* 2009). Il en existe trois sortes : **les fibres oxytalanes** localisées dans le derme formant un réseau perpendiculaire à la jonction dermo-épidermique, **les fibres d'élaunine**, des

fibres élastiques immatures, et les **fibres élastiques matures** constituées de fibrilline-1 et d'un composé amorphe additionnel, l'élastine. L'élastine confère élasticité et résilience permettant à la peau de reprendre sa position d'origine.

Ces protéines fibreuses (collagène et élastine) baignent dans une matrice incolore, transparente, visqueuse, et essentiellement constituée de mucopolysaccharides acides, en particulier d'acide hyaluronique, de glycoprotéines, d'eau et des protéoglycanes (Prost-squarcioni *et al.* 2008). Les **glycosaminoglycanes (GAG)** et les core-protéines associés formant des protéoglycanes, responsables du maintien de l'hydratation de cette matrice sont synthétisés par les fibroblastes.

Les **glycoaminoglycanes (GAG)** se caractérisent par des polysaccharides complexes, linéaires et ramifiés. On retrouve une structure commune, basée sur une unité disaccharidique répétée comprenant une hexosamine (N-acétyl-glucosamine ou N-acétyl-galactosamine) et un acide uronique (acide D-glucuronique ou acide L-iduronique) ou un sucre neutre (Naylor *et al.* 2011). On peut définir six types de glycosaminoglycanes, regroupés en deux familles : les glucosaminoglycanes et les galactosaminoglycanes (*tableau 4*).

Tableau 4 : Principaux glucosaminoglycanes et galactosaminoglycanes retrouvés dans le derme (acide hyaluronique, héparane sulfate, sulfate de chondroïtine et sulfate dermatane).

GAG	Sous famille	Unité disaccharidique	Structure
Acide hyaluronique	glucosaminoglycanes	Acide D-glucuronique, N-acétylglucosamine	
Héparane sulfate	glucosaminoglycanes	Acide glucuronique et acide uronique, N-acétylglucosamine	
Sulfate de chondroïtine	galactosaminoglycanes	Acide D-glucuronique, N-acétylgalactosamine	
Sulfate de dermatane	galactosaminoglycanes	Acide L-iduronique, N-acétylgalactosamine	

L'**acide hyaluronique** est une chaîne linéaire non ramifiée composée d'acide D-glucuronique et de N-acétylglucosamine. Son rôle principal est d'attirer des molécules d'eau (1

g d'acide hyaluronique peut retenir jusqu'à 6 L d'eau). Elle confère à la peau sa souplesse et son élasticité. Environ 50% de l'acide hyaluronique total de l'organisme se trouve dans le derme mais on retrouve également de l'acide hyaluronique synthétisé par les fibroblastes et les kératinocytes dans l'épiderme. L'acide hyaluronique est couramment utilisé en médecine esthétique et en cosmétique comme produit de comblement des rides et d'hydratation.

Les protéoglycanes sont des molécules constituées d'une protéine appelée « core protein » sur laquelle des glycosaminoglycanes (GAG) tels que l'acide hyaluronique, le sulfate de chondroïtine, ou l'héparane sulfate, sont greffés (Naylor *et al.* 2011). La diversité structurale des protéoglycanes permet des interactions spécifiques avec d'autres composants matriciels ou cellulaires. Les protéoglycanes régulent aussi de nombreuses activités cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, et la migration cellulaire. La *figure 19* représente une vue d'ensemble des différents composants (cellulaires et macromolécules) caractérisant le derme

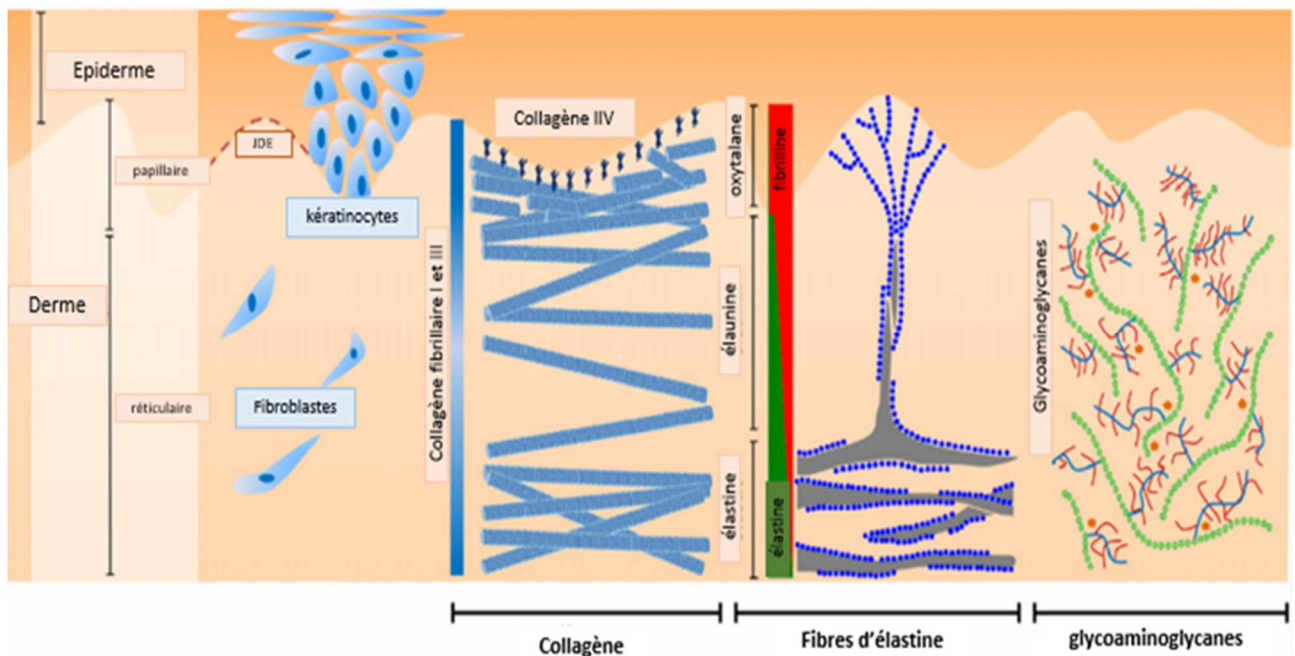


Figure 19 : Composants cellulaires et extracellulaire contenus dans une peau jeune. On retrouve, en fonction des différentes couches, les fibres de collagène, les fibres d'élastines et les glycoaminoglycanes. Les composants cellulaires sont aussi représentés, les kératinocytes et les fibroblastes. JDE : jonction dermique (Naylor *et al.* 2011)

II.2.1.4 L'hypoderme

L'**hypoderme** est la couche la plus profonde et la plus épaisse de la peau. Elle est majoritairement constituée d'adipocytes. L'**hypoderme** est un tissu conjonctif lâche contenant un nombre important de protéoglycanes et de fibres de collagène (Prost-squarcioni. 2006). La fonction principale de l'hypoderme est énergétique. Il assure le stockage et la libération de l'énergie sous forme de lipides. Les adipocytes isolent l'organisme des variations de

température et forment une couche protectrice contre les pressions auxquelles la peau est soumise.

II.2.2 Le vieillissement cutané

Le vieillissement cutané est un processus biologique complexe influencé par la combinaison de facteurs endogènes ou intrinsèques (génétique, métabolisme cellulaire, hormones et processus métabolique) et exogènes ou extrinsèques (exposition chronique à la lumière, pollution, rayonnements ionisants, produits chimiques, toxines). Ces facteurs conduisent simultanément à des altérations structurelles et physiologiques de chaque couche de la peau, modifiant ainsi son apparence (Yaar *et al.* 2007; Langton *et al.* 2010). Ce vieillissement se caractérise par une perte d'élasticité des tissus, une modification de la texture de la peau, et l'apparition d'anomalies superficielles (rides de froncement, pattes-d'oie, sillon naso-génien) ainsi que de taches brunes.

Les phénomènes de vieillissement entraînent un déclin des fonctions de défense, de cicatrisation, de perception et de thermorégulation du tissu cutané. Les manifestations cliniques sont nombreuses et souvent inesthétiques.

II.2.2.1 Le vieillissement cutané extrinsèque

Il existe de nombreux facteurs extrinsèques entraînant le vieillissement cutané tels que le photovieillissement, les molécules provenant du tabac et d'autres addictions, l'environnement (pollution), la nutrition ou encore le stress (*figure 20*). De façon général, une mauvaise hygiène de vie peut impacter négativement et accélérer le vieillissement cutané (rythme de vie, sommeil, alimentation, exposition à un environnement toxique).

Il en résulte une altération de l'ADN mais aussi une activation d'enzymes, les métalloprotéinases, capables de dégrader la matrice extracellulaire (Jenkins. 2002). Le **vieillissement extrinsèque** se traduit par une dégénérescence des fibres de collagène, une augmentation des protéoglycanes et de l'acide hyaluronique ayant leurs fonctions altérées, et une accumulation anormale du tissu élastique appelée « élastose » (*figure 22*).

L'élastose se traduit par une dégradation des fibres élastiques et une dérégulation de la production d'élastine et de fibrine (Labat-Robert *et al.* 2000). Le facteur de transcription AP1 est suractivé, en raison des UV, entraînant une augmentation des Métalloprotéases Matricielles (**MMPs**). Ces **MMPs** sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire.

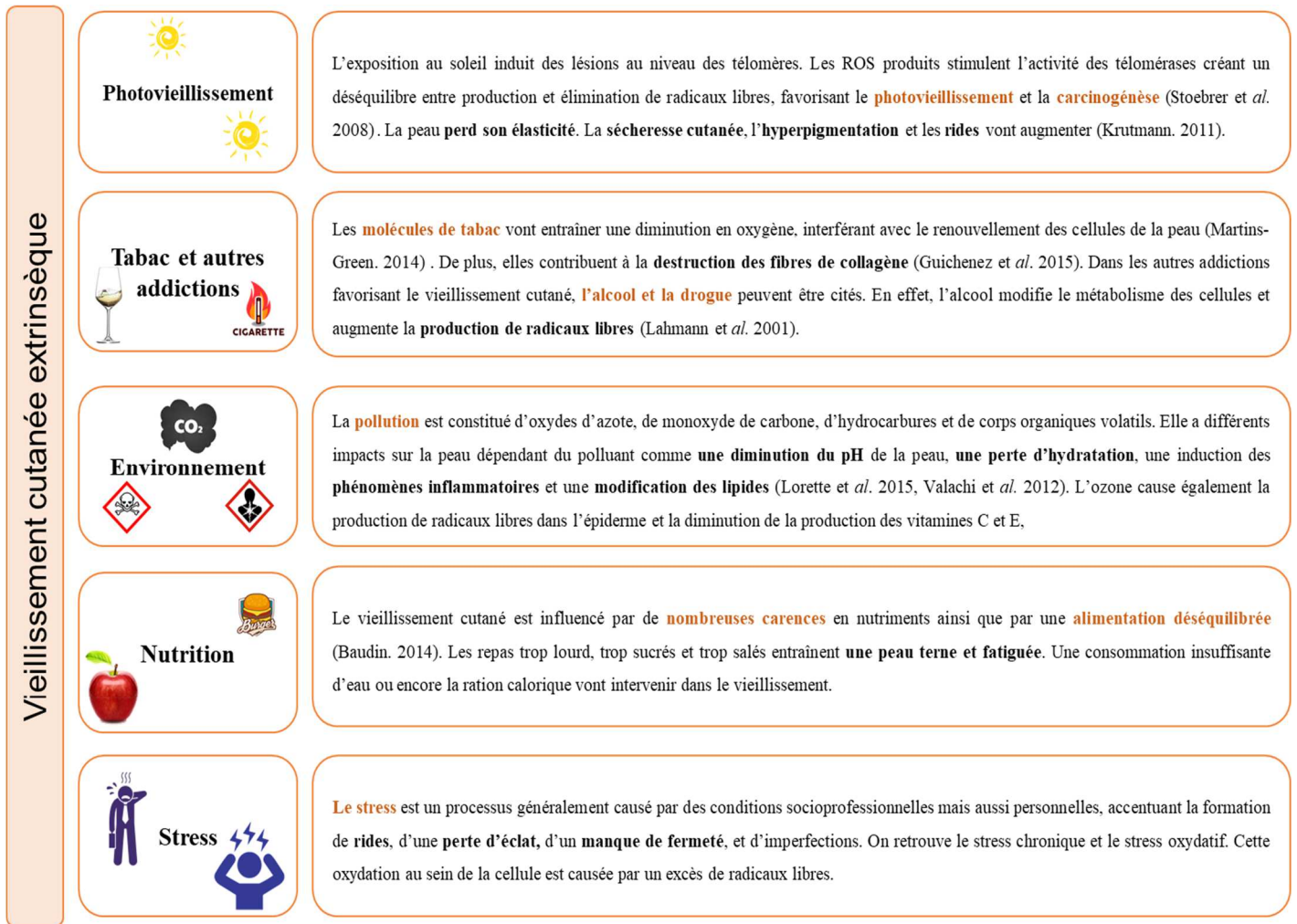


Figure 20 : Principaux facteurs impliqués dans le vieillissement cutané extrinsèque. On retrouve le photovieillessement, le tabac et autres substances addictives, l'environnement, la nutrition et le stress, constituants généraux de l'hygiène de vie.

La dégradation des fibres de collagène (figure 21) et des autres composants de la matrice extracellulaire est due principalement à quatre MMPs : la collagénase MMP1, la gélatinase (92 kDa) MMP2, la gélatinase (72 kDa) MMP9 et la stromelysine MMP3 (Kerkelä et al. 2003; Birkedal-Hansen et al. 1993).

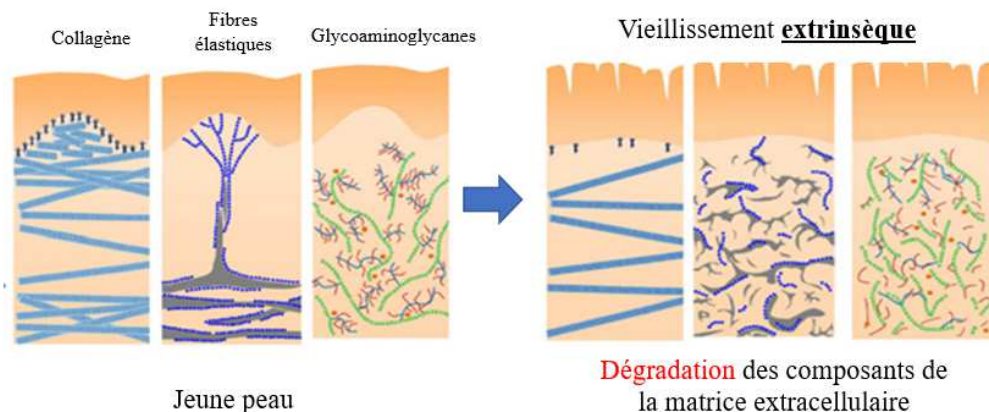


Figure 21: Remodelage de la MEC induit par le vieillissement extrinsèque. (Naylor et al. 2011)

II.2.2.2 Le vieillissement cutané intrinsèque :

Le **vieillissement intrinsèque** est le vieillissement qualifié de « naturel ». C'est un phénomène qui touche tous les organes du corps (Uitto et *al.* 1998). Le vieillissement intrinsèque de la peau est caractérisé par une diminution de la production de collagène et d'élastine, un ralentissement du renouvellement des cellules cutanées et une fonte du tissu graisseux. Le vieillissement est différent chez chaque individu. Certaines personnes vieillissent plus vite que d'autres car chaque individu réagit différemment au phénomène du vieillissement de la peau (Naylor et *al.* 2011). Les causes majeures du vieillissement intrinsèque sont : le stress oxydant et les variations de l'activité hormonale, mais aussi la prolifération cellulaire engendrant le raccourcissement des télomères (*figure 22*).

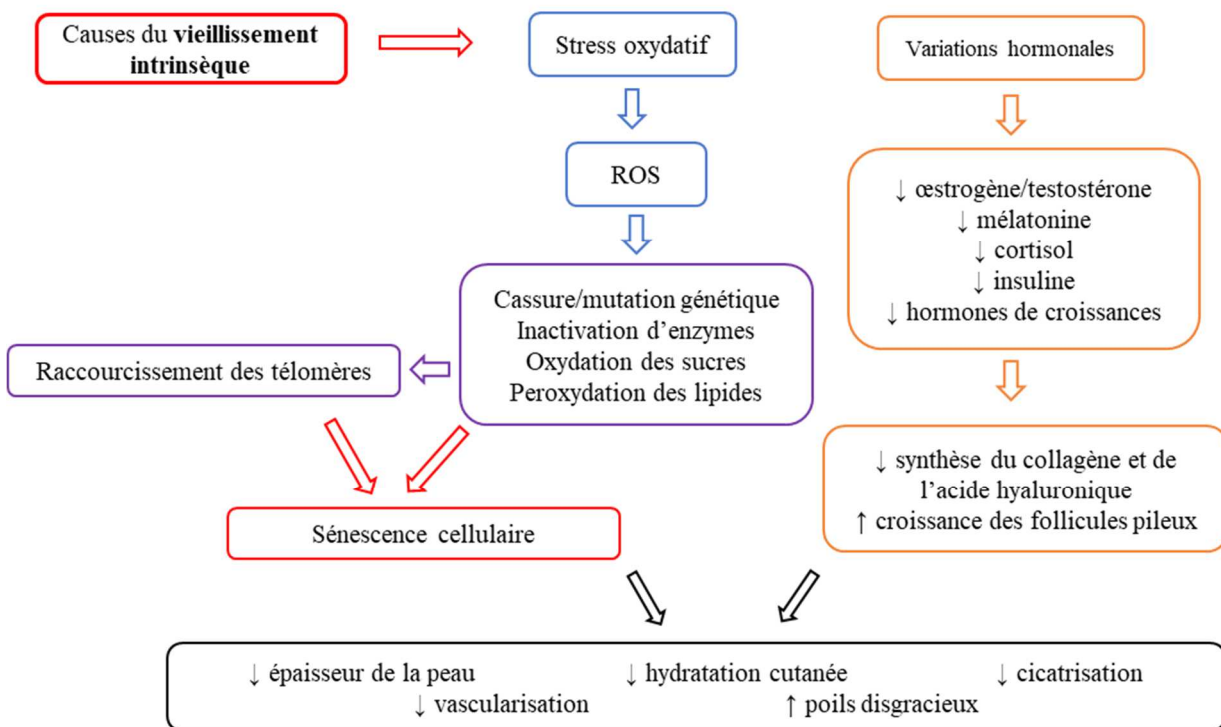


Figure 22 : Les principales causes du vieillissement cutané intrinsèque (stress oxydatifs et variations hormonales) et leurs conséquences au sein de l'organisme

Les principaux effets du vieillissement intrinsèque sur les principaux composants du derme sont les suivants (*figure 23*) :

- une atrophie du collagène de types I et III due à la réduction du nombre de fibroblastes.
- la diminution des fibres élastiques.
- la fragmentation/dégradation des GAGs.
- la diminution de la capacité de l'acide hyaluronique à retenir l'humidité au sein de la peau.

- la diminution des follicules pileux et des glandes annexes engendrant la détérioration du film hydrolipidique protecteur de la peau par la réduction de la sudation et de l'hydratation cutanée (Jenkins. 2002).

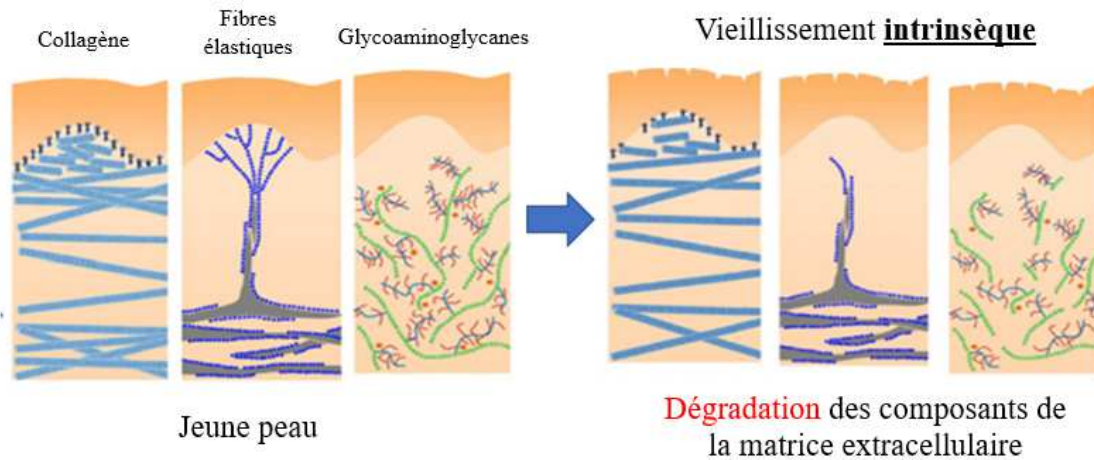


Figure 23 : Remodelage de la MEC induit par le vieillissement intrinsèque. (Naylor et al. 2011)

Le **vieillessement intrinsèque** affecte et modifie l'organisation des principaux composants de la peau. Les fibres de collagène et d'élastine sont moins denses et désorganisées. Les glycoaminoglycanes présents sont fragmentés et leur nombre est diminué. Avec l'âge, une altération de la pigmentation de la peau est également visible, générant de nouveaux besoins chez les consommateurs.

II.2.3 Pigmentation cutanée et éclaircissement cutané

Chez l'homme, la couleur de la peau est le résultat de l'association de divers pigments. Les pigments mélaniques sont responsable à 98% de la coloration de la peau, ils sont produits par les mélanocytes (Gillbro et al. 2011). La pigmentation dépend du nombre, de la forme et du mode de distribution des granules pigmentaires mais aussi des types chimiques de mélanines produites. On retrouve **les eumélanines** de couleur brune ou noire et **les phaeomélanines** de couleur jaune-rouge.

II.2.3.1 Le mécanisme de pigmentation de la peau

a. La mélanogénèse : biosynthèse de mélanine.

La mélanogénèse est le processus physiologique de production de mélanine, le pigment absorbant la lumière responsable de la coloration de la peau (Hearing. 2011). Il est produit dans

les mélanocytes et plus particulièrement dans les mélanosomes, organites membranaires situés à l'intérieur des mélanocytes de la couche basale de l'épiderme (*figure 24*).

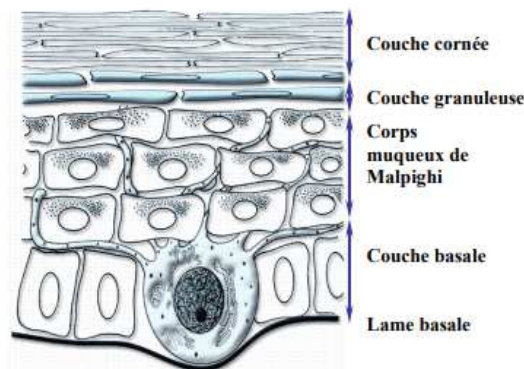


Figure 24: Insertion d'un mélanocyte dans l'épiderme

Une fois la mélanine produite, les mélanocytes transportent les mélanosomes le long de leurs dendrites pour atteindre les kératinocytes voisins. Les mélanosomes se présentent sous la forme de vésicules qui bourgeonnent à partir de l'appareil de Golgi. Au sein de ces mélanosomes, les mélanines sont produites selon un enchaînement de réactions chimiques complexes en présence d'un certain nombre d'enzyme dont la tyrosinase (Seiji et *al.* 1961; Schallreuter et *al.* 1998), la phénylalanine hydroxylase (PHA) et les protéines apparentées à la tyrosinase (TRP-1 et TRP-2) (Hearing 2011).

La **synthèse des mélanines** débute par l'oxydation de la L-tyrosine en L-DOPA, qui à son tour sera oxydée en dopaquinone. Ces deux transformations sont catalysées par une seule et même métalloenzyme, la tyrosinase. A ce stade, la mélanogenèse peut être orientée vers la voie des eumélanines ou vers la voie des phaeomélanines (Jimbow et *al.* 1990). L'orientation vers l'une ou l'autre sera conditionnée par la teneur en dérivés soufrés dans les mélanocytes et plus particulièrement en cystéine ou en glutathion (Jimbow et *al.* 1990).

La **formation des eumélanines** débute par une cyclisation de la dopaquinone en LeucoDOPochrome et se poursuit par une oxydation en dopachrome. La dopachrome est ensuite convertie, soit en 5,6-dihydroxyindole (DHI), soit en acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique (DHICA) par action de la TRP-2 (Tyrosinase Related Protein 2). La DHI et la DHICA sont alors respectivement oxydées par la tyrosinase en indole-5,6-quinone et par la TRP-1 (Tyrosinase Related Protein 1) en acide-5,6-quinone-2-carboxylique (Simon et *al.* 2009; Hearing. 2011).

La **formation de phaeomélanines** fait intervenir des modifications de la L-dopaquinone. Cela débute par une première condensation de la dopaquinone avec la cystéine pour former la cystéinyl-dopa qui sera oxydée en alanyl-hydroxybenzothiazine par la γ -glutamyl transpeptidase. L'alanyl-hydroxybenzothiazine sera ultérieurement transformée en phaeomélanines (Slominski et *al.* 2004) (*figure 25*).

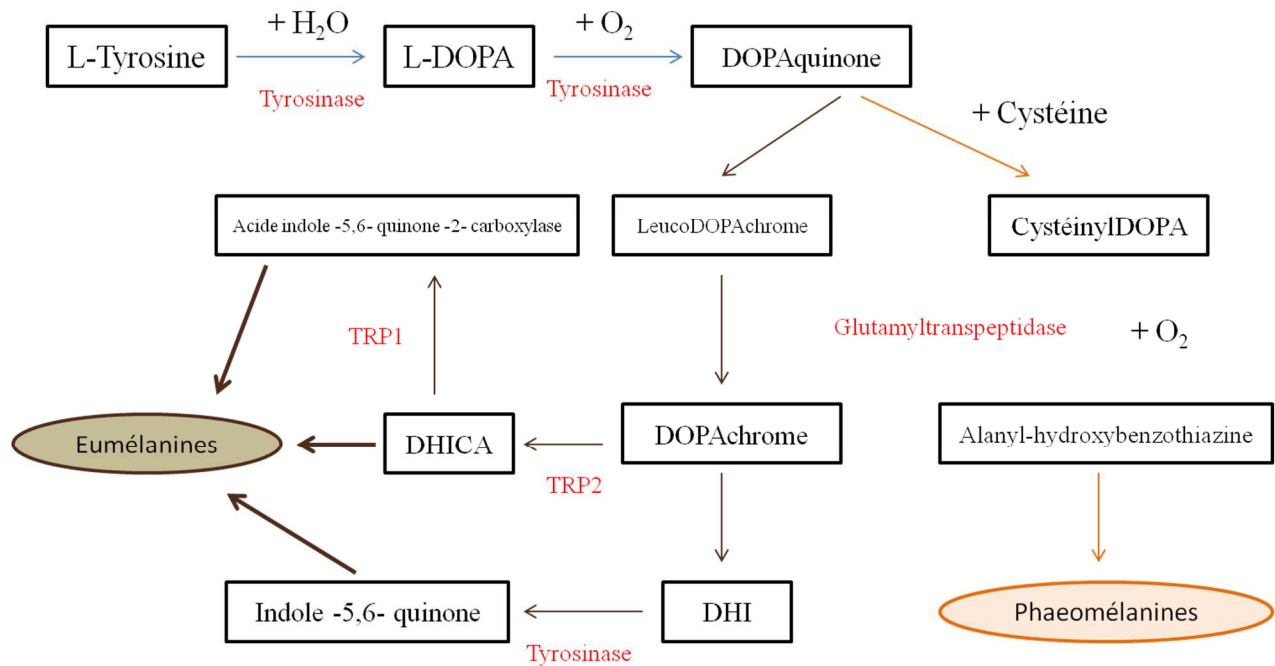


Figure 25 : Voies de synthèse des différents pigments mélaniques retrouvés dans la peau. *l-Dopa*, *l-3,4-dihydroxyphénylalanine*; *DHICA*, *acide 5,6-dihydroxyindole-2 carboxylique* ; *DHI*, *5,6-dihydroxyindole* ; *TRP-1*, *tyrosine-related protein-1* ; *TRP-2*, *tyrosine-r*

b. La tyrosinase et mécanisme de régulation de la mélanogénèse :

La tyrosinase (EC 1.14.18.1) est une enzyme clé de la mélanogénèse. Elle est directement impliquée dans la coloration de la peau et des cheveux. La tyrosinase est une glycoprotéine multifonctionnelle contenant du cuivre de type 3 au niveau de son site actif nécessaire à sa fonction catalytique. Elle est présente dans la membrane du mélanosome (Sánchez-Ferrer et al. 1995). Chez les mammifères, elle catalyse les réactions suivantes :

- L'hydroxylation de la L-tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) ; il s'agit de l'activité monophénol hydroxylase.
- L'oxydation de la L-DOPA en Dopaquinone ; dans ce cas on parle d'une activité catéchol oxydase.
- L'oxydation de la 5,6-dihydroxyindole (DHI) en indole quinone.

La mélanogénèse peut être déclenchée par diverses cytokines et hormones. On retrouve l'hormone stimulant les mélanocytes (**α -MSH**), le facteur de cellules souches (**SCF**), l'endothéline-1 (**ET-1**), l'oxyde nitrique (**NO**), mais aussi l'hormone adrénocorticotrope (**ACTH**) ou encore les prostaglandines (Pillaiyar et al. 2017).

Les facteurs précédents vont enclencher la mélanogénèse par différentes voies de signalisation en activant l'expression de protéines, telles que le facteur de transcription associé à la microphthalmie (MITF), la tyrosinase, la TRP-1 (tyrosine-related protein-1) et la TRP-2

(tyrosine-related protein-2). La *figure 26* illustre les voies de signalisation les plus courantes impliquées dans la synthèse de mélanine.

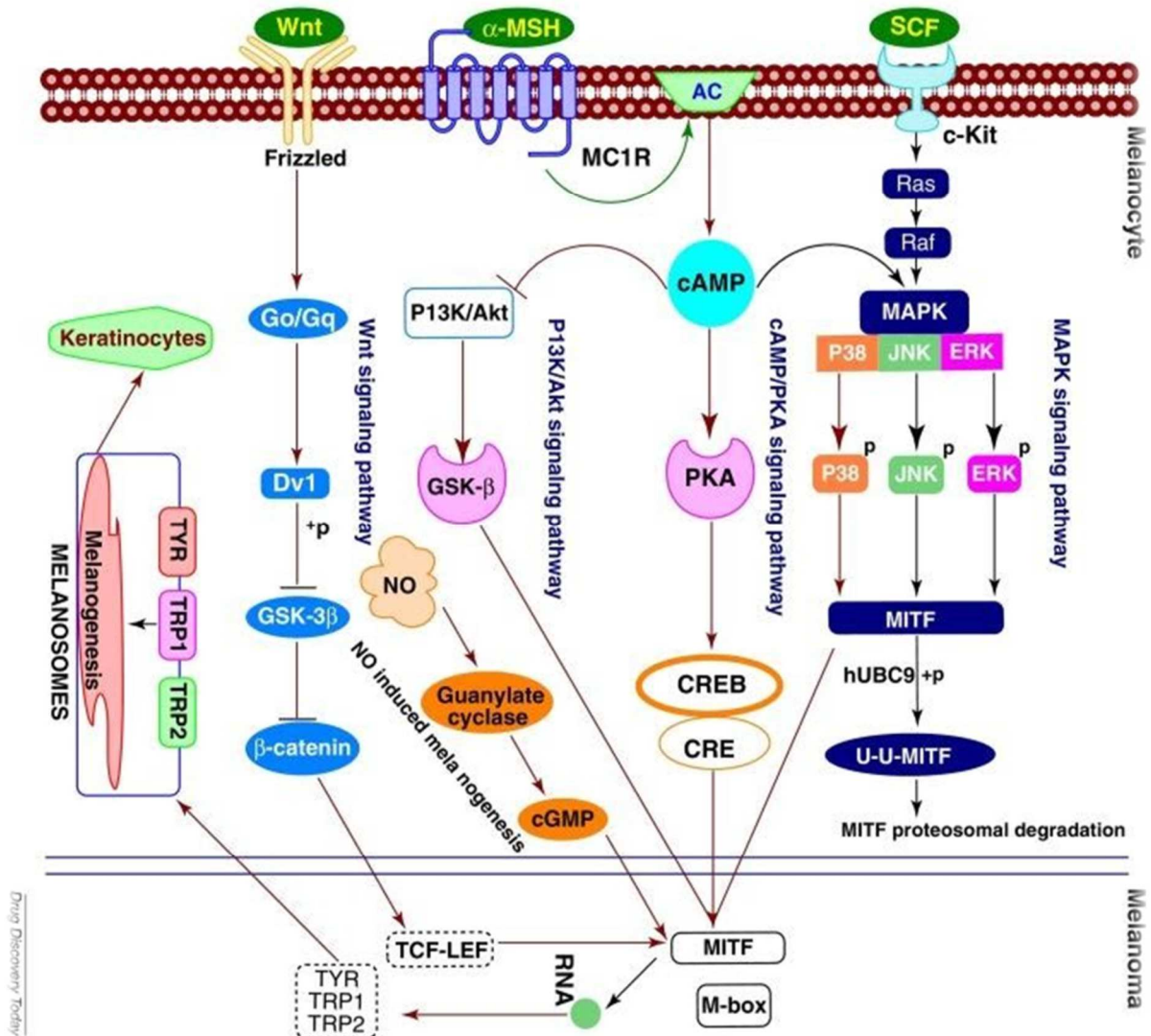


Figure 26 : Régulation de la mélanogénèse par les voies de signalisation principales (Pillaiyar et al. 2017)

Toutes les voies de signalisation déclenchent la transcription du MITF, un régulateur principal de la mélanogénèse, régulant positivement les enzymes de mélanogénèse TYR, TRP-1 et TRP-2 (Vachtenheim et al. 2010). La régulation de la mélanogénèse se fait souvent par le biais de l'activation ou de l'inhibition des enzymes impliquées dans ce processus et notamment de la tyrosinase.

II.2.3.2 Voies d'inhibition de la mélanogénèse

Chacune des **étapes de la mélanogénèse** peut être **inhibée**. Plusieurs approches ont été utilisées afin d'inhiber l'activité catalytique de la tyrosinase et/ou de perturber la synthèse et la libération de mélanine. La stratégie la plus répandue reste l'inhibition de la tyrosinase. On peut distinguer des inhibiteurs se liant de manière réversible à l'enzyme et des inactivateurs de la tyrosinase conduisant à son inactivation irréversible (Chang. 2009; Kim et *al.* 2005).

Les autres stratégies permettant d'inhiber la mélanogénèse sont (Pillaiyar et *al.* 2017; Burger et *al.* 2016; Chang. 2009) :

- Les inhibiteurs de la transcription de l'ARNm de la tyrosinase,
- Les modulateurs de la glycosylation de la tyrosinase et maturation ou accélération de sa dégradation,
- Les inhibiteurs de la voie de signalisation dépendante de l' α -MSH (hormone stimulant les mélanocytes) / AMPc (adénosine monophosphate cyclique) et de la production de mélanine induite ultérieurement par l' α -MSH,
- Les modulateurs de la voie de signalisation des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK),
- Les inhibiteurs de la voie de signalisation du NO,
- Les inhibiteurs du MITF, régulateurs de la formation et du transfert de mélanosomes,
- Les régulateurs inducteurs d'activité de MC1R (récepteur de la mélanocortine 1),
- Les inducteurs de l'autophagie, un processus de dégradation cellulaire qui affecte la couleur de la peau (Murase et *al.* 2013).

Ces différentes stratégies d'inhibition de la mélanogénèse sont utilisées dans de nombreuses formulations cosmétiques. Il est d'ailleurs important de distinguer différents types de produits.

On retrouve les agents éclaircissants et les agents de blanchiment cutané. Le blanchiment bloque la production du pigment mélanique (Couteau et *al.* 2016). L'éclaircissement ne bloque pas la production du pigment mélanique, mais il en empêche la surproduction et permet d'estomper les taches pigmentaires afin d'unifier le teint. Les agents éclaircissants peuvent être utilisés sur les cicatrices, en particulier sur les cicatrices d'acné pigmentées, ou chez les femmes enceintes présentant un masque de grossesse lié à la stimulation de la production de mélanine par les hormones sexuelles féminines lorsque la peau est exposée au soleil, pour uniformiser la couleur de la peau (Tunzi et *al.* 2007). Les agents éclaircissants sont très populaires dans les pays asiatiques. En effet, avec un niveau d'hydratation plus élevé, les peaux asiatiques sont sensibles aux troubles d'hyperpigmentation, et présentent rapidement des irrégularités de pigmentation.

Une distinction doit être faite entre les cosmétiques et les médicaments. Des agents dépigmentants peuvent être utilisés afin d'alléger la pigmentation de la peau non affectée par

le vitiligo. Le vitiligo est une affection cutanée chronique caractérisée par des parties de la peau qui perdent leur pigmentation lorsque les cellules pigmentaires de la peau meurent ou sont incapables de fonctionner (Iannella et *al.* 2016).

II.2.3.3 Les agents d'éclaircissement cutané

Il est important de dissocier les traitements dermatologiques comme l'hydroquinone et ses dérivés, l'acide rétinol ou la trétinoïne, et les produits cosmétiques éclaircissants. A titre d'exemple, l'**hydroquinone** inhibe l'action de la tyrosinase, mais semble aussi détruire les mélanocytes par la production de radicaux libres et interférer avec les mélanosomes (Papaspyrides et *al.* 1988) (*figure 27*). Elle est interdite dans les produits cosmétiques en Europe depuis le 1er mars 2000.

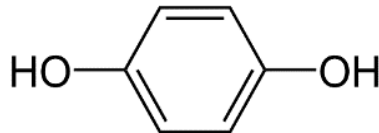


Figure 27 : Structure chimique de l'hydroquinone

Les laboratoires Galderma ont lancé sur le marché une crème à triple combinaison sous le nom de crème Tri-Luma[®] (Laboratoires Galderma, Fortworth, TX, États-Unis). Cette émulsion, contient 4% d'hydroquinone, 0,05% de trétinoïne et 0,01% d'acétonide de fluocinolone. Ce produit est utilisé pour des sujets souffrant d'hyperpigmentation post-inflammatoire post-acnéique (Callender. 2004) Il existe aussi le rétinol ou le rétinaldéhyde, qui, connus pour leurs pouvoirs anti-oxydants, semblent interférer avec le transport de mélanosome, inhiber la transcription de la tyrosinase ou augmenter le turn-over cellulaire des kératinocytes (Ortonne. 2006).

Dans les produits dermocosmétiques, deux types de principes actifs sont retrouvés. Des principes actifs exerçant une action indirecte sur les mélanines déjà formées (divers agents exfoliants, peelings superficiels ou profonds) et des principes actifs agissant sur le processus de formation de mélanine (vitamines C, E ou B3, d'arbutine ou encore d'acide kojique).

- **Les vitamines et ses dérivés**

Les vitamines sont utilisées en tant qu'agents éclaircissants depuis les années 1990. En effet, l'**acide ascorbique** (= vitamine C) et ses dérivés sont connus pour réduire et/ou inhiber la chaîne d'oxydation transformant la tyrosine en mélanine (Katsambas et *al.* 2001) (*figure 28*). Il semblerait que la vitamine C affecte les dendrites des mélanocytes via les kératinocytes (Régner et *al.* 2005).

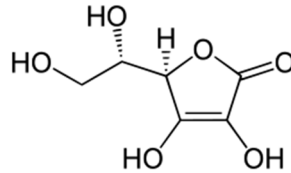


Figure 28 : Structure chimique de l'acide ascorbique

On retrouve aussi la **vitamine B3** appelée la « niacinamide » (figure 29). La niacinamide interfère avec le transfert des mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes et possède une activité antioxydante (Hakozaki et al. 2002).

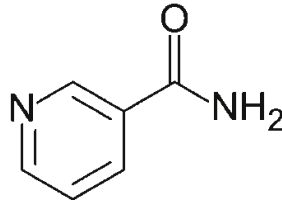


Figure 29 : Structure chimique de la vitamine B3

- **L'arbutine et ses dérivés**

L'**arbutine** est une hydroquinone glycoside avec 2 isoformes, le 4-hydroxyphényl- α -glucopyranoside et le 4-hydroxyphényl- β -glucopyranoside (figure 30).

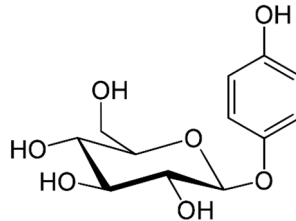


Figure 30 : Structure chimique de l'arbutine

Elle est obtenue à partir de diverses plantes appartenant aux familles des Ericaceae (Busserole, Fraîse, Myrtille, Bruyère), Saxifragaceae, Asteraceae, Rosaceae, Lamiaceae et Apiaceae. L'arbutine bloque l'activité de la monophénolase et semble diminuer la teneur en mélanine avec peu de cytotoxicité (Pop. 2009; Qin et al. 2014). Une série d'analogues, les désoxy arbutines, montrent également des effets éclaircissants comme la désoxyarbutine (4 - [(tétrahydro-2H-pyran-2-yl) oxy] phénol) qui serait plus efficace et peu cytotoxique (Hamed et al. 2006)

- **L'acide kojique et ses dérivés**

L'**acide kojique** (ou 5-hydroxy-2-(hydroxyméthyl) -4H-pyran-4-one) a été découvert en 1907 par Saito dans des cultures du champignon *Aspergillus oryzae* (figure 31).

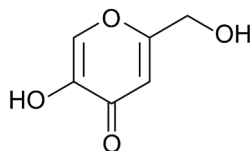


Figure 31: Structure chimique de l'acide kojique

Il intervient dans le processus de dépigmentation via différents mécanismes. L'acide kojique capture l'ion cuivre empêchant l'activation de la tyrosinase (Saghaie et *al.* 2013) et il inhibe la polymérisation de la 5,6-dihydroxyindole (Cabanes et *al.* 1994).

L'acide kojique a été commercialisé en 1955 mais montre peu d'efficacité et provoque des réactions allergiques. Il a donc été modifié afin de diminuer sa cytotoxicité et de palier à son instabilité (Burnett et *al.* 2010). Par exemple, en 2006, une équipe a mis en évidence une molécule constituée de deux acides kojiques. Cette molécule se montre peu cytotoxique et inhibe considérablement la tyrosinase (Lee et *al.* 2006).

- **Les autres molécules dépigmentantes**

D'autres molécules présentent des propriétés éclaircissantes bien connues et sont utilisées en dermocosmétique (*tableau 5*) .

Tableau 5 : Exemple de molécules présentant des propriétés éclaircissantes et pouvant rentrer dans la composition de produits dermocosmétiques

Molécules	Mécanismes d'actions	Références
Sel de mercure	Compétition avec les ions cuivre dans le site actif de la tyrosinase Inhibe la production de l- dopaquinone	(Weldon et <i>al.</i> 2000)
Acide azélaïque (un acide dicarboxylique en C9)	Inhibe l'activité tyrosinase Effet cytotoxique sur les mélanocytes humains.	(Kim et <i>al.</i> 2005)
Aléosine (glycoprotéine)	Inhibiteur compétitif de la tyrosinase	(Lynch et <i>al.</i> 2011)

Néanmoins, nombre de ces molécules provoquent différents effets secondaires limitant leur utilisation par les consommateurs tournant le marché des éclaircissants vers l'utilisation de molécules dites « vertes » .

II.2.3 Le marché mondial des cosmétiques anti-âge et anti-tâche

A cause du vieillissement de la population et de la quête perpétuelle de jeunesse, le marché des cosmétiques est un marché hautement concurrentiel et en pleine expansion, d'une valeur de plus de 425 milliards d'euros dans le monde en 2016 (Couteau et *al.* 2016; Arora et *al.* 2012).

En 2016, le marché européen des cosmétiques et des soins personnels était le plus important au monde (Cosmetics Industry. 2019). Les soins de peau représentent 39 % des produits cosmétiques retrouvés sur le marché mondial (L'Oréal. 2018). Parmi les soins de peau, deux types de produits sont particulièrement recherchés par les consommateurs : les produits anti-âge et les produits anti-tache.

II.2.3.1 Les cosmétiques anti-âge

Dans notre société, tout signe de vieillesse, comme les rides, l'affaissement de la peau ou encore une peau plus fragile et moins élastique, est à bannir. Ainsi, la santé est directement liée à l'apparence physique et aux signes extérieurs de vieillesse. Ces signes sont assimilés à de la négligence ou un manque de soin. L'industrie des produits anti-âge se base sur cette évolution des mentalités afin de vendre au plus grand nombre de personnes leurs produits permettant de conserver une certaine jeunesse.

Des recherches ont mis en évidence que les personnes les plus susceptibles d'acheter des produits anti-âge sont les femmes de plus de 55 ans (Muisse et *al.* 2010). Cependant, des études laissent penser que les femmes achètent de plus en plus tôt ce type de cosmétique. Une enquête réalisée auprès de 2000 femmes en Grande-Bretagne par CACI microlift a démontré que l'âge moyen auquel elles commencent à se soucier de l'apparition des rides était de 24 ans (Young. 2014).

On retrouve de nombreux types de produits cosmétiques anti-âge (Montagnat-Rentier et *al.* 2014) :

- Les tenseurs et hydratants (acide hyaluronique, le chitosane, l'élastine et le collagène),
- Les agents de desquamation (les alpha-hydroxyacides et les rétinoïdes),
- Les anti-radicaux libres (la vitamine E, C, les caroténoïdes, la Nicotinamide, la coenzyme Q10, etc.),
- Les stimulants cellulaires (stimulant la production du collagène, de l'acide hyaluronique et de l'élastine, les glycoprotéines et le rétinol),

- Les molécules maintenant l'équilibre de la peau (les inhibiteurs des métalloprotéinases).

De nombreux laboratoires se partagent le marché de l'anti-âge. On retrouve les laboratoires L'Oréal, Uriage, Avène, La roche Posay, Liérac, Vichy, Caudalie, Galénic, Nuxe ou encore Bioderma. Chaque laboratoire possède son produit anti-âge « phare » (figure 32).



Figure 32 : Exemples de crèmes anti-âge retrouvées sur le marché française d'après Montagnat-Rentier et Rachidi 2014

Ce secteur est constamment à la recherche d'innovations et de nouveaux principes actifs. De ce point de vue, le monde marin est susceptible d'ouvrir de nombreuses possibilités. Les macroalgues sont déjà largement exploitées par l'industrie cosmétique et de nombreux extraits montrent des activités anti-âges (tableau 6).

Tableau 6 : Exemples de molécules algales démontrant des propriétés anti-âges

Composés	Macroalgues	Action anti-âge	Référence
Phlorotannins (Phlorofucofuroeckol A, dieckol, eckol, phloroglucinol, 8.8' -bieckol)	<i>Eisenia bicyclis</i> , <i>Ecklonia kurum</i>	Inhibition de la hyaluronidase	(Shibata et al. 2002)
Fucophloroethol, bieckol, phlorofucofuroeckol, 7-phloroeckol	<i>C. tamariscifolia</i> , <i>C. usneoides</i>	Inhibition de la hyaluronidase	(Ferrerres et al. 2012)
6,6'-bieckol	<i>Ecklonia cava</i>	Régulation de l'expressions des MMP-2 et -9 par l'activation sur la voie NF- κ B	(Zhang et al. 2010)
Dieckol-1- (3', 5'-dihydroxyphénoxy) -7- (2', 4', 6'-trihydroxyphénoxy) 2,4,9-trihydroxydibenzo-1,4, -dioxines	Algues brunes	Inhibition de l'expression des MMP-1 , MMP-3 et MMP-13	(Thomas et al. 2013)
Composés phénoliques	<i>Ecklonia stolonifera</i>	Action anti-âge via l'inhibition de MMP-1	(Min-Jeong et al. 2006)
Chlorophylle c, Fucoxanthine	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Action anti-âge via l'inhibition de MMP-1	(Vo et Kim 2012)
Extrait méthanolique	<i>C. pilulifera</i>	Inhibition de l'expression de MMP-9 et -2 de manière dose-dépendante	(Wang et al. 2015)
Extrait non renseigné	<i>Meristotheca dakarensis</i>	Stimulation de la synthèse de glycosaminoglycanes et des collagènes I/III	(Couteau et al. 2016)
Extrait non renseigné	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Stimulation de la synthèse du syndécan-4, protéine importante de la matrice extracellulaire	(Couteau et al. 2016)
Lipopeptide d'algue	<i>Ulva lactuca</i>	Anti-élastase, stimulation de la synthèse du collagène	(Pereira 2018)
Peptides	<i>Pyropia yezoensis</i>	Stimulation de la synthèse du collagène en activant la voie du signal TGF- β / Smad	(C.-R. Kim et al. 2017)
Tripeptide (arginine, glycine, acide aspartique)	<i>Ulva lactuca</i>	Stimulation de la synthèse de collagène via la voie de TGF- β	(Brunt et Burgess 2018)
Hydrolysats peptidiques	<i>Ulva pertusa</i>	Stimulation de la synthèse collagène en inhibant la MMP-1	(Brunt et Burgess 2018)
Fucoïdanes	Algues brunes	Inhibition de l'expression de la MMP-1 induite par les UVB in vitro	(Thomas et Kim 2013)
Ulvanes	<i>Ulva</i> sp.	Stimulation de la production de collagène et d'acide hyaluronique	(Adrien et al. 2017)
Ulvanes	<i>Ulva lactuca</i>	anti-élastase, stimulation de la synthèse du collagène	(Pereira 2018)
Polysaccharides sulfatés	<i>Undaria pinnatifida</i>	Inhibition de la collagénase et l'élastase in vitro	(Brunt et Burgess 2018)
Fucoïdanes	<i>Fucus vesiculosus</i>	Stimulation de la production de collagène et inhibition de l'élastase/MMP-1	(Y. Sun et CHAVAN 2017)
Polysaccharides sulfatés	<i>Padina boergesenii</i>	Formation de collagène et régénération épidermique	(Pereira 2018)

L'activité anti-âge est souvent portée par des composés phénoliques, tanniques, peptidiques ou polysacchariques et vont très généralement inhiber des MMPs. On retrouve des extraits de macroalgues marines dans de nombreux complexes anti-âge déjà commercialisés (figure 33).



Figure 33: Exemples de crèmes anti-âge contenant des extraits de macroalgues marines sur le marché français.

II.2.3.2 Les cosmétiques anti-tache

La demande pour les produits anti-tache, qui étaient jusque-là réservés aux femmes, connaît une augmentation significative concernant les hommes, en particulier dans les pays asiatiques. L'évolution des modes de vie et l'urbanisation rapide, ainsi que l'augmentation du pouvoir d'achat conduit les pays asiatiques à devenir le plus grand marché de produits éclaircissants avec un taux de croissance important jusqu'en 2022. Comme le prévoyait le dernier rapport de recherche publié par Fact.MR, le marché mondial des produits éclaircissants cutanée enregistrera un taux de croissance annuel impressionnant pour la période allant de 2017 à 2022. Les ventes mondiales de produits éclaircissants cutanés devraient représenter plus de 23 000 millions de dollars américains d'ici fin 2022 (L'Oréal. 2018).

Il existe déjà de nombreux produits commercialisés combattant l'hyperpigmentation. Néanmoins, le marché des agents anti-tache semble être une niche économique dans les pays européens. Certains produits commerciaux sont décrits dans la *figure 34*.

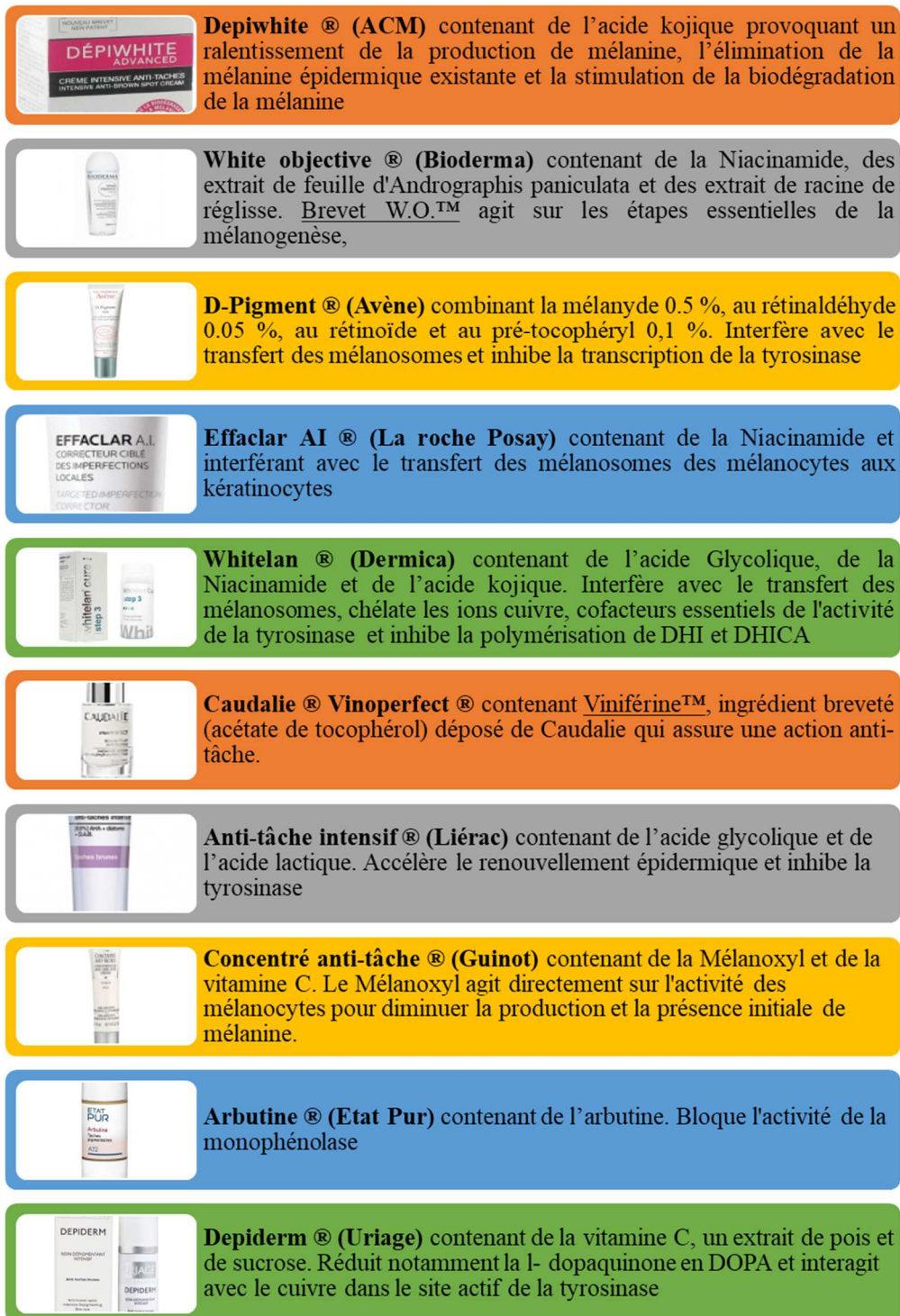


Figure 34: Exemples de produits anti-tâches commercialisés et contenant des actifs éclaircissants chimiques.

Un nombre important de produits anti-tache commercialisés au cours de la dernière décennie se sont révélés toxiques ou ont montrés des profils de sécurité discutables lors d'une exposition à long terme (Olumide et *al.* 2008). Face à leur utilisation grandissante, l'Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, France) et la DGCCRF (Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la sécurité) ont mis en place une campagne nationale de contrôle du marché de ces produits et des analyses des risques sanitaires

auxquels les utilisateurs se sont exposés. Cette étude française a permis la création d'une liste de produits de blanchiment de la peau non conformes ou dangereux (Rapport AFSSAPS. 2011 ; Burger et al. 2016). Cependant, il est à noter que la réglementation cosmétique reste hétérogène en fonction des pays, où certains produits interdits en France sont autorisés ailleurs.

Compte tenu de l'intérêt grandissant des consommateurs pour des produits cosmétiques plus naturels, il est important de développer des alternatives moins toxiques et plus naturelles pour répondre à ce marché croissant. La recherche d'inhibiteurs naturels de la mélanogénèse montre que des extraits d'algues ou de produits marins pourraient constituer des sources potentielles de nouveaux ingrédients éclaircissants (tableau 7).

Tableau 7: Exemple de molécules algales démontrant des propriétés anti-tâches

Composés	Macroalgues	Action anti-tâche	Référence
Diphloréthohydroxycarmalol	<i>Ishige okamurae</i> <i>Yendo</i>	Inhibition de la tyrosinase et inhibition de la formation de mélanine	(Heo et al. 2010)
Fucoïdanes	<i>Fucus vesiculosus</i> , <i>Ascophyllum nodosum</i>	Inhibition indirecte de la mélanogénèse par la voie ERK	(Z.-J. Wang et al. 2017; Pereira 2018).
Galactanes	<i>Gracilaria fisheri</i>	Inhibition de l'expression de protéines impliqué dans la mélanogénèse	(Pratoomthai et al. 2018)
7-phloroeckol	<i>Ecklonia cava</i>	activité anti-tyrosinase	(N. Y. Yoon et al. 2009)
Dérivés du phloroglucinol	Algues brunes	Inhibition de la tyrosinase en raison de leur capacité à chélater le cuivre	(H.-M. D. Wang et al. 2015)
Fucoxanthine	<i>Laminaria japonica</i>	Inhibition de l'activité de la tyrosinase chez les cobayes	(H.-M. D. Wang et al. 2015)
Monoterpénoïdes	<i>Prasiola japonica</i>	Inhibition de l'expression d'une protéine MITF impliqué dans la synthèse de mélanine	(S. H. Park et al. 2018).
Flavonoïde sulfaté	<i>Phyllospadix Iwatensis</i>	Inhibition de la tyrosinase	(Kwak et al. 2016)
Extraits contenant des flavonoïdes et des tanins	<i>Pistacia lentiscus</i>	Inhibition de la tyrosinase	(Dziado et al. 2016)
Extrait éthanolique	<i>Sargassum polycystum</i>	Inhibition de l'activité de la tyrosinase cellulaire de mélanocyte B16F0	(Chan et al. 2011)
Extrait méthanolique	<i>Sargassum polycystum</i>	Inhibition de la tyrosinase et inhibition de la formation de mélanine	(Chan, et al. 2011)
Extraits contenant stéroïdes, flavonoïdes, phénols hydroquinone et saponine	<i>Caulerpa</i> sp.	Inhibiteur de la tyrosinase	(Pereira 2018)
Extrait non renseigné	<i>Endarachne binghamiae</i> , <i>Schizymenia dubyi</i> , <i>Ecklonia cava</i> , <i>Sargassum silquastrum</i>	Inhibition de l'activité de la tyrosinase et réduction de la synthèse de mélanine	(Cha et al. 2011)

L'inhibition de la tyrosinase est l'activité biologique la plus souvent démontrée concernant les composés provenant de macroalgues marines, et celle-ci est le plus souvent portée par des composés flavonoïques, polysaccharidique ou par des phlorotannins algaux. On retrouve quelques produits contenant des principes actifs naturels algaux déjà commercialisés (figure 35) :

	<p>Révélation Lumière® Phytomer® contenant un extrait de <i>Laminaria digitata</i>, Ce produit diminue de 14 % la surface totale des taches en inhibant la mélanogénèse,</p>
	<p>Crème Jour Éclat Royal® Abellie® contenant un extrait d'<i>Undaria pinnatifida</i> en inhibant la tyrosinase et la mélanogénèse.</p>
	<p>Crème Solution taches d'Algotharm® contenant un extrait d'<i>Chondrus crispus</i> participant à la diminution des tâches brunes en inhibant la mélanogénèse,</p>
<p>Wakamine Wakamine XP Wakamine 1%</p>	<p>Wakamine 1% ou XP® Givaudan® contenant un extrait d'<i>Undaria pinnatifida</i> inhibant l'activité de la tyrosinase et limitant de 39% la production de mélanine</p>
	<p>Crème anti-tâche oléoactive Bio® Cap Cosmetics® contenant Sea Shine® actif breveté de <i>Laminaria digitata</i> inhibant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse des mélanosomes et dans la migration des mélanocytes vers les kératinocytes</p>

Figure 35: Exemples de crèmes anti-âge contenant des extraits de macroalgues marines sur le marché français.

C'est dans ce contexte que vient s'inscrire le premier objectif de cette thèse : **Identifier des applications potentiellement commercialisables pour les différentes fractions d'*Ulva rigida* et d'*Ulva intestinalis* extraites et purifiées selon le procédé développé par la société SEPROSYS.** Il est intéressant de cibler les activités anti-âge et anti-tâche pour lesquels les molécules sont à haute valeur ajoutée et où le retour sur investissement peut être rapide pour l'entreprise SEPROSYS.

II.3 Axe Inflammation : *Ulva*, remède neuroprotecteur.

L'**industrie nutraceutique** est estimée à 184 milliards de dollars, et est en constante évolution. Le chiffre d'affaires attendu en 2022 est de 302 milliards de dollars (Santini et *al.* 2018). Il s'agit donc d'un secteur à haut potentiel et en constante évolution. Les nombreuses activités pharmacologiques des extraits provenant d'algues démontrent qu'ils représentent une **alternative** probable à l'utilisation de drogues conventionnelle pour la prise en charge ou la prévention de pathologies associées à des **statuts inflammatoires chroniques**. C'est le cas des pathologies du système nerveux central (déclin cognitif, trouble de l'humeur, dépressions, anxiété, ...).

II.3.1. Inflammation et réponse immunitaire

II.3.1.1 Rôle et déroulement physiologique

La **réaction inflammatoire** a pour but d'éliminer des agents pathogènes ou des corps étrangers, et de réparer les lésions tissulaires en initiant la cicatrisation ou la création de nouveaux vaisseaux (l'angiogénèse) (Medzhitov. 2008). L'**inflammation** est une réponse à des inducteurs endogènes tels que les tumeurs, les nécroses dues à un défaut de vascularisation, et les dérèglements immunitaires (allergies, maladies auto-immunes) mais aussi à des inducteurs exogènes tels qu'une infection bactérienne ou virale, des lésions tissulaires ou cellulaires dues aux agents physiques (traumatisme, chaleur, froid, irradiation) et chimiques (toxines, venins) (*figure 36*).

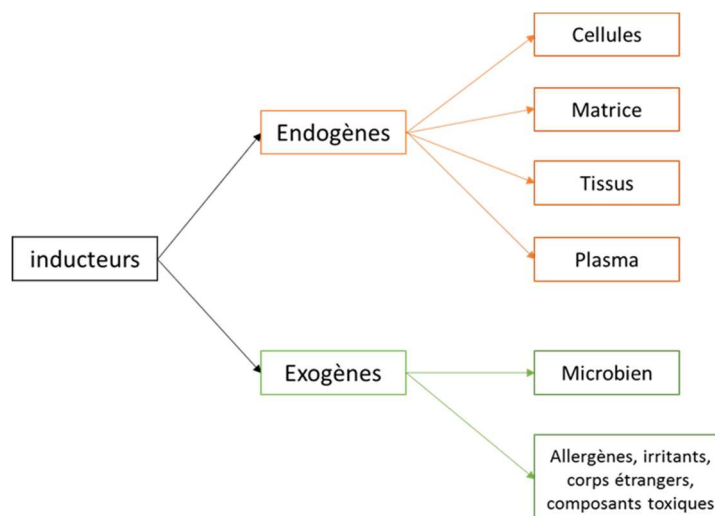


Figure 36 : Inducteurs (endogènes et exogènes) de la réponse inflammatoire (Medzhitov. 2008)

Selon le déclencheur, la réponse inflammatoire va orchestrer la mobilisation et l'interaction de différents types de cellules et de molécules de signalisation (*figure 37*). La réponse inflammatoire peut être divisée en **trois phases** (Blétry et *al.* 2002) :

- Une **phase d'initiation** qui fait suite à un signal de danger d'origine exogène ou endogène et le recrutement d'effecteurs primaires et l'activation des cellules inflammatoires. L'inflammation s'initie par une réaction de « **reconnaissance** » faisant intervenir des cellules immunitaires (monocytes, macrophages, lymphocytes) mais aussi des protéines circulantes (anticorps, protéines du complément, facteur de Hageman...) (Serhan et *al.* 2005) ;
- Une **phase d'amplification** avec la mobilisation et l'activation d'effecteurs secondaires (les cellules endothéliales, les cellules sanguines et les cellules résidentes tissulaires). Après la phase de reconnaissance, un ensemble de cellules et de médiateurs, dont l'ordre d'intervention est complexe et variable, vont se mettre en action.
- Une **phase de résolution** et de réparation qui tend à restaurer l'intégrité du tissu agressé.

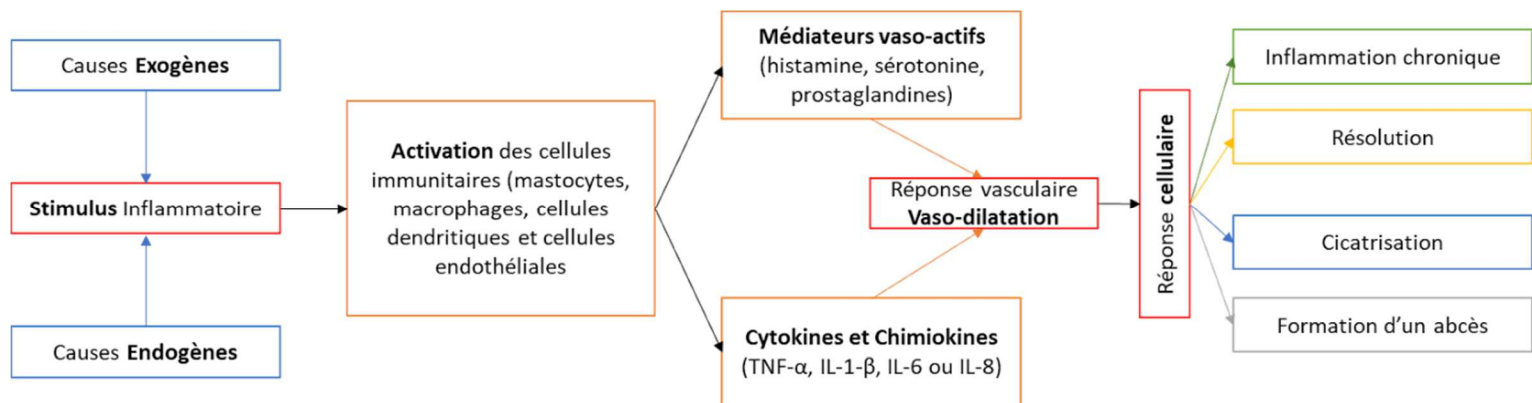


Figure 37 : Déclenchement de la réaction inflammatoire (causes exogènes et endogènes) et conséquences et initiation de la réaction inflammatoire (réponse cellulaire) (Medzhitov 2008)

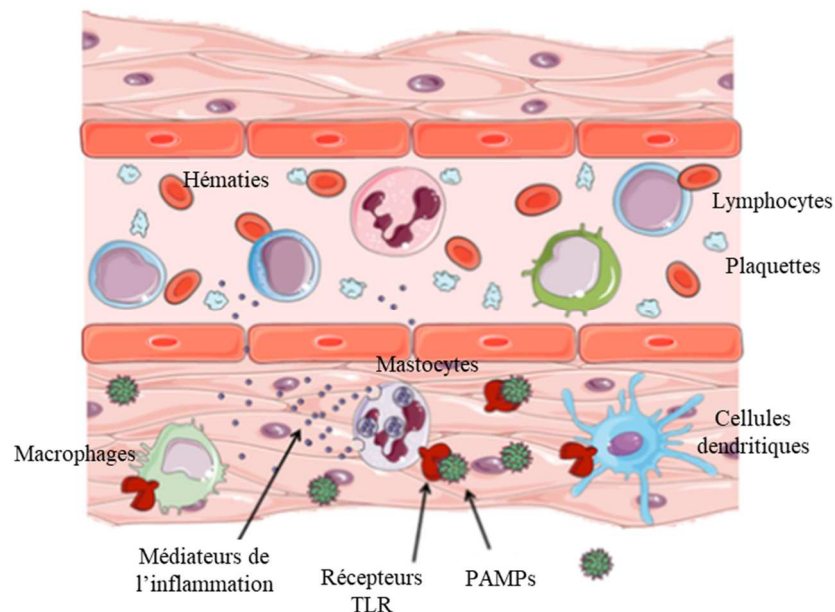
Il existe une très grande complexité des mécanismes de réaction inflammatoire. On retrouve deux types d'inflammation : **l'inflammation aiguë** et **l'inflammation chronique** (Majno et *al.* 2004). **L'inflammation aiguë** se caractérise par une réponse immédiate et de courte durée, provoquant l'activation d'un nombre important de cellules inflammatoires au niveau du site lésionnel. Sa résolution ne laisse que très peu de séquelles tissulaires. **L'inflammation chronique** est une inflammation qui persiste, et parfois s'aggrave laissant s'installer d'autres pathologies plus sévères.

Lors d'une réponse inflammatoire, la défense de l'hôte et le maintien de l'homéostasie correspond à une réaction de phase aiguë (Baumann et *al.* 1994). La réaction de phase aiguë

met en jeu des médiateurs de l'inflammation appelés cytokines et comprend trois composantes : une **composante locale** (réaction inflammatoire), une **composante systémique** (activation de l'hématopoïèse, modifications métaboliques, diminution des nutriments et minéraux) et une **composante centrale** (fièvre, activation de l'axe corticotrope, fatigue, diminution de la prise alimentaire).

II.3.1.2 Rôle des médiateurs cellulaires et des cytokines

Les cellules résidentes au niveau tissulaires sont capables d'identifier immédiatement un microorganisme. On retrouve les mastocytes, les macrophages ou encore les cellules dendritiques (figure 38). Elles sont attirées par les bactéries en détectant des formyl-peptides que celles-ci produisent.



Les mastocytes : ils sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires et chimiotactiques, libérés par dégranulation. On y retrouve l'histamine les prostaglandines, les leucotriènes et les thromboxanes, et des cytokines : IL-1 β , IL-6, TNF α aussi appelé le triade inflammatoire.

Les macrophages : ils phagocytent le pathogène. L'interaction entre les pathogènes et les récepteurs spécifiques PRR entraîne une activation des macrophages via la sécrétion de médiateurs de l'inflammation (Murray et al. 2011). Ils participent l'organisation de la réponse inflammatoire en sécrétant de nombreuses cytokines comme la triade inflammatoire.



Figure 38: Présentation des médiateurs cellulaires impliqués dans l'inflammation (<http://acces.ens-lyon.fr/>. 2013)

Les cytokines jouent un rôle primordial dans l'induction de la réponse inflammatoire. Leur activité se manifeste à de très faibles concentrations, par liaison à des récepteurs membranaires. Les cytokines constituent une famille hétérogène divisée en deux grands groupes : les **cytokines pro-inflammatoires** et les **cytokines anti-inflammatoires** (figure 39).

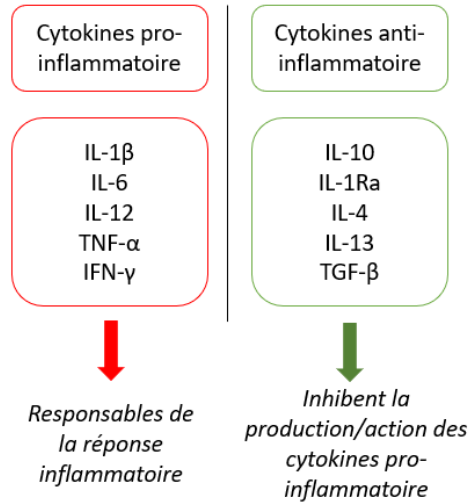


Figure 39 : Cytokines pro- et anti-inflammatoire impliquées dans la réaction inflammatoire

Les principales cytokines inflammatoires mises en jeu sont **l'interleukine-1β** (IL-1β), **le facteur de nécrose tumorale** TNF-α et **l'interleukine-6** (IL-6). L'IL-1β et le TNF-α peuvent chacun induire la production de l'autre ainsi que la synthèse d'IL-6 (Brouckaert et al. 1993; Libert et al. 1990). Cette triade inflammatoire exerce son effet de façon synergique et souvent redondante.

L'interleukine-1β (IL-1β) est une cytokine pro-inflammatoire de la famille de l'IL-1. L'IL-1β est sécrétée par les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules épithéliales, les kératinocytes et les fibroblastes synoviaux (Dinarello. 2011). Cette cytokine est impliquée dans la réponse des cellules hôtes à une infection. Sa fixation sur leur récepteur fonctionnel l'IL-1RI va induire l'activation des voies de signalisation NFκB (Nuclear Factor-Kappa B) et MAPK (mitogen-activated protein kinases). L'IL-1β est considérée comme le chef d'orchestre de la synthèse des cytokines et joue un rôle majeur dans le développement de la réponse inflammatoire à un stimulus tel que la présence de lipopolysaccharide bactérien appelé LPS (Layé et al. 2000).

Le facteur de nécrose tumorale (TNF-α) est une cytokine pro-inflammatoire (Mukhopadhyay et al. 2006). Le TNF-α est produit par de nombreux types cellulaires dont les macrophages, les cellules dendritiques, les monocytes, les cellules microgliales et les astrocytes. Cette cytokine interagit avec deux récepteurs : les récepteurs au TNF de type I et de type II (Probert. 2015).

L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les cellules de l'immunité innée (lymphocytes T et B, macrophages et cellules microgliales) (Mogensen. 2009). Cette cytokine multifonctionnelle régulée par NF-kappa B peut activer divers types de cellules portant le récepteur de l'IL-6 (IL-6R) (Rose-John et al. 2004). L'IL-6 est sécrétée dans

le stade initial de l'inflammation, elle va se propager dans la circulation sanguine et induire une production accrue de protéines pro-inflammatoires. La principale voie de signalisation activée par la fixation de l'IL-6 sur son récepteur est la voie JAK-STAT (Hunter et *al.* 2015).

Les récepteurs de reconnaissance de l'agent pathogène (PRR) comprennent les récepteurs de type Toll (**TLR**). Ils stimulent différentes voies de signalisation et améliorent la transcription. Les différentes voies de signalisation et la transcription de l'ARNm de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6, TNF- α et IL-1 β sont activées par les récepteurs de reconnaissance de l'agent pathogène (PRR) et plus particulièrement, par les récepteurs de type Toll (**TLR**).

III.1.3.3 Les récepteurs TLR et induction du signal

Les **toll-like récepteurs (TLR)** sont les récepteurs transmembranaires reconnaissant des structures exogènes appelées « pathogen associated molecular pattern » (PAMP) et des structures endogènes « damage-associated molecular patterns » (DAMP). Le domaine extracellulaire permet la reconnaissance et la liaison avec les PAMPs. Le domaine cytoplasmique permet la transduction des signaux à la cellule et initie des cascades de signalisation en aval (Akira et *al.* 2006) (*figure 40*). Les TLR sont exprimés par de nombreux types cellulaires, **immunitaires** et **non-immunitaires** tels que les cellules dendritiques, les macrophages, les mastocytes, les lymphocytes T et B ainsi que fibroblastes et cellules épithéliales (Essakalli et *al.* 2009). Les TLR sont aussi exprimés par des cellules du **système nerveux central** tels que les cellules microgliales, astrocytes et neurones (Essakalli et *al.* 2009).

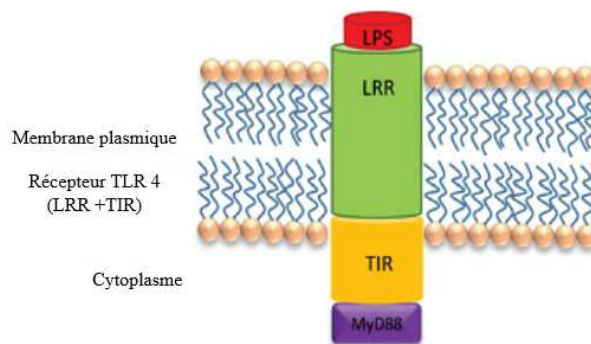


Figure 40 : Récepteur au lipopolysaccharide, le TLR4 (Shabab et *al.* 2016.)

Parmi les récepteurs TLR, le **TLR4** est impliqué dans la reconnaissance du lipopolysaccharide (**LPS**). Le **LPS**, une endotoxine présente dans la membrane externe des bactéries Gram négatif, induit une réponse inflammatoire systémique par récepteur TLR. La liaison du **LPS** au **TLR4** à la surface des cellules active plusieurs voies de transduction du signal, provoquant l'activation de NF- κ B (Zhang et *al.* 2000). L'activation de cette voie peut se faire via la liaison d'une protéine adaptatrice, le facteur de différenciation myéloïde 88

(MyD88), aux TLR via leurs domaines TIR. On trouve une voie dépendante à la MyD88 et une autre voie indépendante à la MyD88 (*figure 41*) :

- **La voie dépendante de MyD88** : En réponse au **LPS**, le **TLR4** interagit avec MyD88 permettant le recrutement des kinases. L'interaction avec MyD88 déclenche une cascade de phosphorylations conduisant à l'expression de cytokines pro-inflammatoires, telles l'IL-6, IL-1 β ou le TNF- α .
- **La voie indépendante de MyD88** : Des macrophages murins déficientes en MyD88 induisent la production d'IFN- β lorsqu'ils sont stimulés au **LPS**. La protéine TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β) induit une voie MyD88-indépendante (Yamamoto et al. 2003). Le **TLR4** interagit par l'intermédiaire de TRAM (TRIF-related adaptor molecule) conduisant à l'activation de NF- κ B (Yamamoto et al. 2003).

L'activation de la voie NF- κ B permet la production de cytokines et d'enzymes pro-inflammatoires, notamment l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS) pouvant entraîner une neuroinflammation (Hayden et al. 2008).

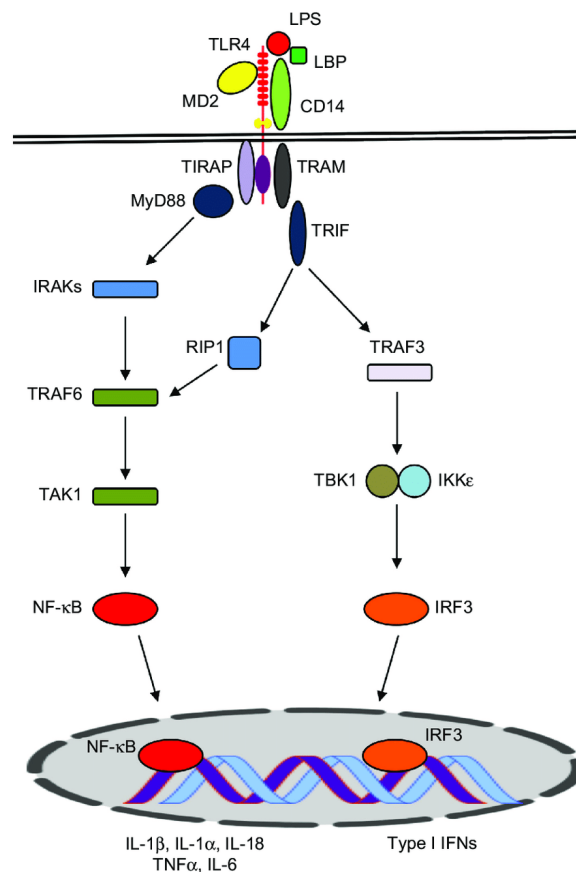


Figure 41: Les voies de signalisation des récepteurs TLR4. La voie dépendante de MyD88 est responsable de l'activation précoce de la NF- κ B et de la MAPK, qui contrôle l'induction des cytokines pro-inflammatoires et contribuant également aux réponses inflammatoires (Diamond et al. 2015)

L'oxyde nitrique synthase permet la synthèse de monoxyde d'azote (**NO**) qui est un médiateur clé de l'inflammation. Ce messager intracellulaire régule l'activité, la croissance et la mort de nombreux types de cellules immunitaires et inflammatoires (Tripathi et *al.* 2007). Le **LPS**, l'interféron gamma (IFN- γ), le TNF- α et l'IL-1 β peuvent induire l'expression de l'iNOS. Cette activation de l'expression de l'iNOS peut conduire à la production excessive de NO et induire des maladies inflammatoires telles que des maladies neurodégénératives ou à des pathologies psychiatriques (Lyman et *al.* 2014). L'IL-1 β et le TNF- α peuvent donc jouer indirectement un rôle essentiel dans l'inflammation pathologique (Baumann et *al.* 1994).

La réaction inflammatoire induite va impacter l'ensemble de l'organisme par l'intermédiaire des cytokines libérées dans la circulation sanguine. Il est observé une altération des métabolismes lipidique, protéique, et glucidique (Lennie et *al.* 1995) mais aussi des modifications au niveau cérébral, correspondant ainsi à une réponse spécifique à ces différentes altérations.

II.3.2 Rôle de l'inflammation dans le cas de pathologies du système nerveux central associées aux troubles métaboliques

Le cerveau ne possède pas réellement de système immunitaire. Il reste isolé du reste de l'organisme par la barrière hémato-encéphalique (BHE) empêchant la migration des cellules du système immunitaire systémique.

II.3.2.1 Communication entre le système immunitaire et le système nerveux et voies de signalisation

La **barrière hémato-encéphalique** (BHE) est l'ensemble des structures séparant le compartiment sanguin de l'encéphale des deux compartiments liquidiens extracellulaires du système nerveux central. La BHE joue un rôle essentiel dans la régulation des échanges d'ions et de nutriments entre le sang et le cerveau, mais aussi dans la protection contre les agents pathogènes (Varatharaj et *al.* 2017) (*figure 42*). Les jonctions serrées de la BHE sont perméable aux médiateurs pro-inflammatoires telles que **TNF- α** , **IL-6** ou **IL-1 β** pouvant influencer l'intégrité et moduler la perméabilité de la BHE en modifiant la résistance des jonctions serrées. Cette stimulation par des cytokines va influencer directement le système nerveux central et induire une inflammation.

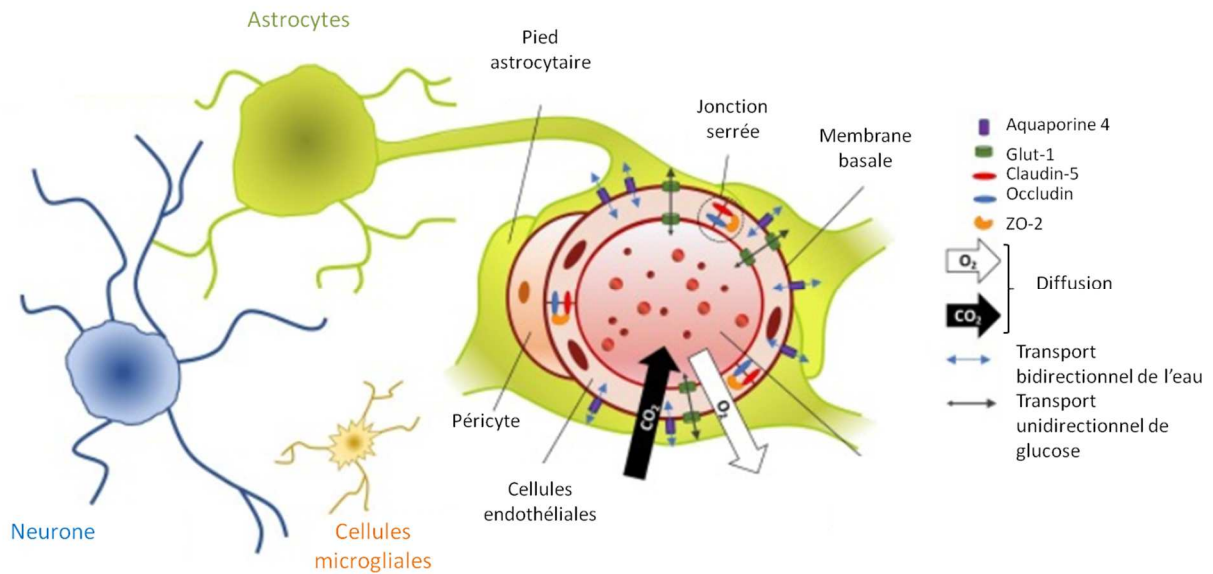


Figure 42 : La barrière hémato-encéphalique (BBE) est un complexe impliquant les cellules endothéliales, les péricytes, les processus de pied d'extrémité des astrocytes et la membrane basale

Il existe de nombreuses voies de signalisation et de communication permettant la transmission de l'inflammation du système nerveux périphérique vers le système nerveux central. Par exemple, les cytokines pro-inflammatoires et/ou le LPS vont pouvoir induire une inflammation via la voie des organes circumventriculaires (figure 43).

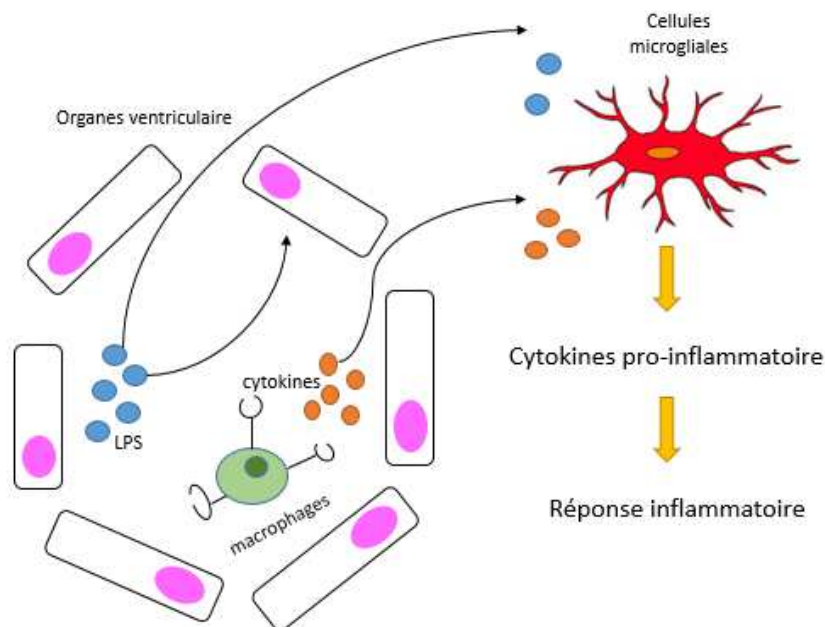


Figure 43 : Voies de reconnaissance induites par la fixation du LPS et/ou de cytokines pro-inflammatoire permettant d'induire et de transmettre l'inflammation au système nerveux central

On retrouve une seconde voie de communication mettant en jeu l'activation du nerf vague (Dantzer. 1994). En effet, les neurones du nerf vague expriment les récepteurs de l'IL-1 et vont être stimulés par l'IL-1β circulante (Ek et al. 1998) (figure 44).

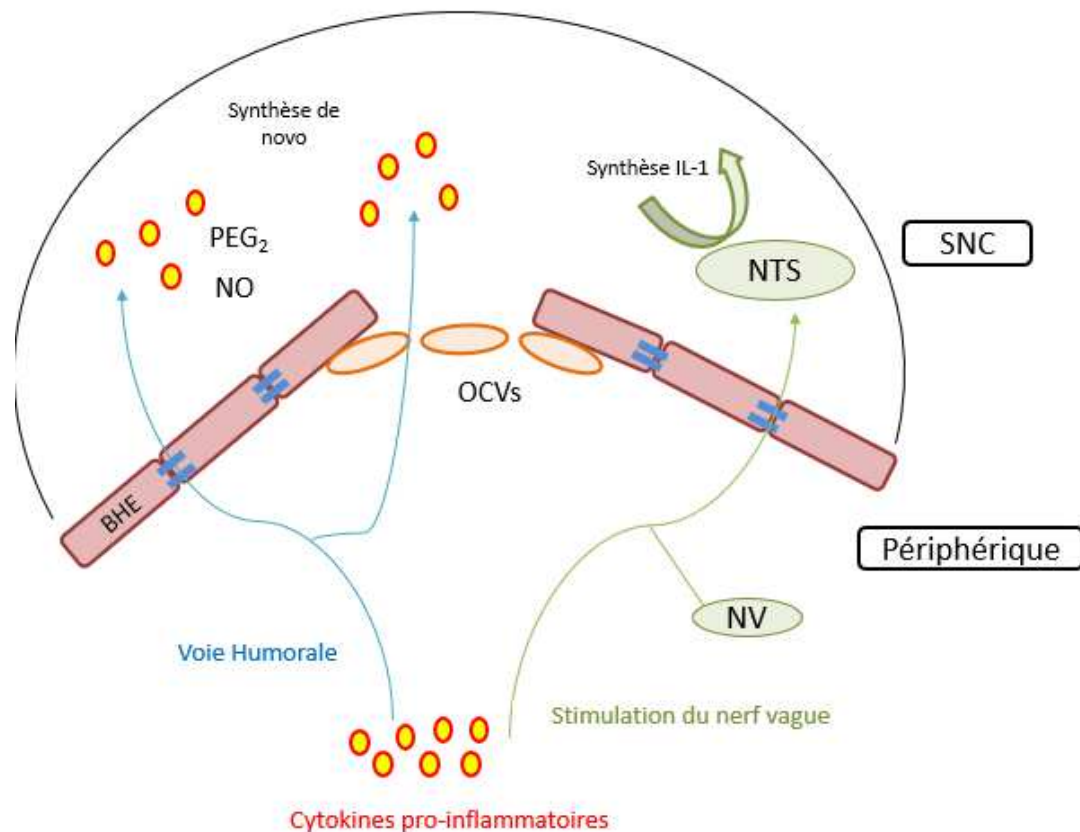


Figure 44 : Système de communication entre le système immunitaire et le système nerveux. NO : monoxyde d'azote, NTS : Noyau du tractus solitaire, OCVs : Organes circumventriculaires, PGE2 : Prostaglandines de type E2, SNC : système nerveux central, IL-1 : interleukine 1, NV : nerf vague

L'activation de la réaction immunitaire au niveau central se fait par l'intermédiaire de deux types cellulaires : **les cellules microgliales** et **astrocytaires**. Les **cellules microgliales** vont exprimer à leur surface le récepteur **TLR4** où les **LPS** vont venir se fixer. Leur reconnaissance par les récepteurs va initier la transcription de gènes codant pour des cytokines, induisant la voie NF-KB et la progression de la réponse inflammatoire.

L'activation des cellules microgliales et des astrocytes ainsi que la libération de facteurs inflammatoires sont définies par le terme « **neuroinflammation** ». Une activation anormale de ces cellules peut être reliée à différentes maladies neurodégénératives, à des troubles psychiatriques tels que le stress, la dépression et la schizophrénie, ainsi que des troubles métaboliques, des syndromes tels que l'hypertension, l'obésité et le diabète de type 2.

Dans certains contextes pathologiques, l'inflammation persiste et s'installe. Dans ce cas, on parle **d'inflammation dite chronique**. Les cellules peuvent rester activées pendant de longues périodes, libérant des quantités de cytokines contribuant à la neurodégénérescence à long terme (Lyman et al. 2014). La sécrétion de cytokines est moins élevée qu'en réponse à un pathogène mais reste constante. On parle donc **d'inflammation chronique à bas bruit**.

II.3.2.2 Conséquences de l'inflammation sur les troubles de l'humeur et cognitifs

Comme vu précédemment, l'action des cytokines peut être responsable de modifications comportementales. L'action prolongée de cytokines provoque et semble être responsable de l'apparition et du développement de symptômes neuropsychiatriques provoquant des **troubles de l'humeur** et des **troubles cognitifs** (Capuron et al. 2002; Capuron et al. 2003). En effet, des sujets recevant des immunothérapies, ont montré des troubles de l'humeur, regroupant à la fois des symptômes de type dépressif et anxieux, et des troubles cognitifs (Bonaccorso et al. 2001). De plus, il a été montré que l'administration de LPS à des volontaires sains induit une augmentation du taux de cytokines corrélée à des symptômes d'anxiété, de dépression, ainsi que de déficits cognitifs (Yirmiya et al. 2000) et ces symptômes dépressifs semblent être plus courant (60%) chez les patients soumis à un traitement par l'IFN α (Capuron et al. 2002).

a. Les troubles de l'humeur

Les troubles de l'humeur regroupent à la fois les symptômes **dépressifs** et les troubles **anxieux** (Capuron et al. 2017; Castanon et al. 2015).

La dépression est un trouble mental qui touche mondialement plus de 322 millions de personnes. Elle est la première cause d'incapacité dans le monde (OMS. 2017). La dépression se traduit par le diagnostic suivant :

- Humeur dépressive présente toute la journée
- Diminution marquée de l'intérêt ou du plaisir
- Perte ou gain de poids significatif (5 %) en l'absence de régime, ou diminution ou augmentation de l'appétit.
- Insomnie ou hypersomnie.
- Agitation ou ralentissement psychomoteur.
- Fatigue ou perte d'énergie.
- Sentiment de dévalorisation ou de culpabilité excessive ou inappropriée.
- Diminution de l'aptitude à penser ou à se concentrer ou indécision
- Pensées de mort récurrentes, idées suicidaires

Les troubles anxieux peuvent être décrits comme une peur anticipée qui se traduit par des réactions physiologiques (tachycardie, sueurs...) et comportementales. Il existe plusieurs types de troubles anxieux (DSM-IV, American Psychiatric Association) :

- Agoraphobie
- Trouble panique avec/sans agoraphobie
- Anxiété généralisée
- Phobie sociale
- Trouble obsessionnel compulsif

- Etat de stress post-traumatique
- Etat de stress aigu
- Trouble anxieux induit par une substance
- Trouble anxieux non spécifié

Les patients dépressifs présentent une augmentation des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α (Howren et *al.* 2009). Il a donc été suggéré que l'activation du système immunitaire pourrait être impliquée dans la pathogenèse de la dépression (Maes. 1999). Pour appuyer cette hypothèse, il a été démontré que l'administration de cytokines pro-inflammatoires induit systématiquement des symptômes dépressifs chez des patients (Capuron et *al.* 2004).

b. Les troubles cognitifs

Les troubles **cognitifs** désignent des **troubles mentaux** affectant principalement la mémoire, mais aussi la perception et la résolution de problèmes.

Les individus présentant une infection montrent très souvent des altérations de divers processus cognitifs allant de l'attention à la mémoire. Lors de l'administration de **LPS** provoque, chez des sujets volontaire sains, une diminution des performances de la mémoire corrélée à l'augmentation des taux de cytokines dont l'IL-6 et le TNF α (Reichenberg et *al.* 2001). Autre exemple, une augmentation significative de cytokines a été décelée chez des patients atteints de troubles cognitifs légers (Magaki et *al.* 2007). De plus, une équipe a pu mettre en évidence le rôle de l'IL-17A, cytokine impliquée dans l'inflammation chronique, dans la survenance de troubles cognitifs chez des rats ayant reçu des injections de LPS (Sun et *al.* 2015). Une activation chronique du réseau de cytokines peut donc être à l'origine de troubles cognitifs importants.

Par conséquent, des troubles de l'humeur et de la cognition ont pu être décelé dans certaines pathologies comprenant une composante inflammatoire chronique. Dans notre société occidentale, les facteurs favorisant un état inflammatoire chronique sont multiples. Une des pathologies associée à un statut inflammatoire chronique est l'obésité. L'obésité est devenue une véritable fléau mondial puisque le nombre d'obèses augmente dans les pays à PIB élevés et dans les pays à PIB plus faibles (Matta et *al.* 2018).

II.3.2.3 Obésité, inflammation à bas bruit et altération de l'humeur et de la cognition

L'Organisation Mondiale de la Santé définit l'obésité comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé » et place sa prévention comme étant une priorité. L'obésité peut être associée à une **réaction inflammatoire chronique** à bas bruit. En effet, il faut savoir que les adipocytes régulent le métabolisme en

sécrétant certaines cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α ou encore l'IL-6 mais aussi certaines hormones (Tilg et Moschen 2006). Parmi ces hormones, les adipocytes vont sécréter la résistine qui est impliquée dans la régulation de l'inflammation et la stimulation de l'expression des cytokines inflammatoires incluant l'IL-1 β , le TNF α , l'IL-6 et l'IL-12 (Silswal et al. 2005). De plus, une accumulation progressive de macrophages au cours du développement de l'obésité a été observée. Cette accumulation de macrophages associée à la présence d'adipocytes serait donc responsable de la forte augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires maintenant un statut inflammatoire constant (Weisberg et al. 2003).

Les complications métaboliques associées à l'obésité peuvent provoquer l'apparition d'un diabète de type 2 (Owens et al. 1998). Le **diabète de type 2** est associé à une augmentation de la concentration de cytokines inflammatoires. De plus, les altérations de l'axe corticotrope provoqués par l'obésité se traduisent, à leur tour, par une libération forte et prolongée de cytokines pro-inflammatoires (Sorrells et al. 2009). L'obésité peut donc être un facteur de risque important dans le développement des troubles cognitifs et de l'humeur lié, en outre, à la libération constante de cytokines pro-inflammatoire.

En effet, **l'obésité** est corrélée à **des déficits cognitifs** comme l'attention, les fonctions exécutives et la mémoire (Alosco et al. 2014). De nombreuses études montrent un effet délétère de l'obésité sur les fonctions cognitives. Par exemple, des patients obèses et diabétiques possèdent des scores de fatigue et des altérations cognitives plus élevés. D'autres études ont permis de mettre en évidence l'impact d'un régime hyperlipidique et hyperglycémique sur les capacités cognitives. Les régimes hypercaloriques semblent contribuer à l'altération de la régulation du glucose, facteur important de déclin cognitif associé au diabète de type 2 (Winocur et al. 2005). De plus, l'obésité s'accompagne d'une diminution de l'estime de soi, d'une insatisfaction globale de la vie, de phobies et d'hostilité (Brunault et al. 2012). De nombreuses données suggèrent un lien entre **l'obésité** et la **dépression** (Luppino et al. 2010). En effet, les symptômes dépressifs sont augmentés chez des patients souffrant de diabète de type 2 et/ou d'obésité. La prévalence élevée de troubles de l'humeur chez les patients obèses est modulée par le degré d'adiposité : 23 % des patients obèses présentent des symptômes dépressifs, alors que la prévalence de la dépression est de 11 % chez les individus ayant un IMC normal (Carey et al. 2014). Il existe également un lien entre **obésité** et **anxiété**. Une étude réalisée en 2007 sur des femmes obèses montrent que 75 % d'entre elles présentent un score positif au test d'auto-évaluation de la dépression, et environ 60 % souffrent d'anxiété moyenne à élevée (Lykouras. 2008)

La survenue fréquente de **troubles de l'humeur** et de la **cognition** chez des patients souffrant d'**obésité** suggère l'existence d'une relation entre ces différentes pathologies. La perturbation de la réponse inflammatoire et des altérations de l'axe corticotrope pourraient être à l'origine de ces différentes pathologies. Le développement d'une inflammation à bas bruit chez des patients obèses a permis de caractériser l'obésité comme une maladie inflammatoire chronique. Les maladies inflammatoires sont devenues l'une des principales causes de problèmes de santé dans le monde et ont eu une influence considérable sur les coûts des soins de santé. Néanmoins, certains traitements sont à l'origine d'effets secondaires néfastes lors d'une utilisation prolongée. Les algues marines ont été identifiées comme un réservoir sous-exploité de

composés anti-inflammatoires uniques. Ceux-ci incluent les polyphénols, les polysaccharides sulfatés, les terpènes, les acides gras, les protéines et plusieurs autres bioactifs. La consommation de ces algues marines pourrait constituer un moyen de défense contre la physiopathologie de nombreuses **maladies inflammatoires chroniques**.

II.3.3 Le potentiel anti-inflammatoire des macroalgues marines

Les propriétés anti-inflammatoires des macroalgues sont devenues un sujet de recherche médicale majeur. Elles pourraient fournir des effets protecteurs sur la pathogenèse des maladies inflammatoires. Sur la base de nouvelles avancées, de nombreux composés anti-inflammatoires ont été isolés à partir de macroalgues marines (*tableau 8*).

Sur la période 1999-2015, 99 composés purifiés provenant de macroalgues marines et possédant une activité neuroprotectrice ont été identifiés (Alghazwi et al. 2016). Parmi ces composés, 57 proviennent de macroalgues brunes, 28 proviennent de macroalgues rouges et seulement 14 proviennent de macroalgues vertes (*figure 45*).

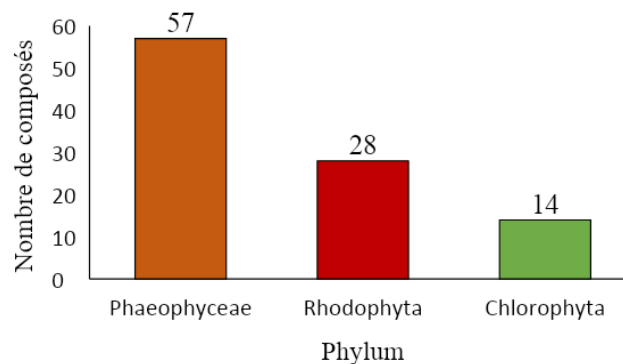


Figure 45 : Distribution des composés neuroprotecteurs identifiés dans des macroalgues entre 1999 et 2015. Ce bilan est basé sur trois bases de données majeures : Sciences Direct, PubMed et Scopus (Alghazwi et al. 2016)

Parmi ces 99 composés, seulement 13 composés provenant de macroalgues marines possèdent une activité anti-inflammatoire démontrée (*tableau 8*). Les macroalgues vertes, elles, restent encore peu exploitées dans ce domaine d'application.

Tableau 8 : Exemple de macroalgues ayant des propriétés anti-inflammatoires connues

Composés	Macroalgues	Molécules	Activités	Référence
Composés phénoliques	<i>Eisenia bicyclis</i>	Phloroglucinol, eckol, dieckol, 7-phloroeckol, phlorofucofuroeckol A et dioxinodehydroeckol	Inhibition de la production de NO induite par le LPS	(Jung et al. 2013)
	<i>P. dentata</i>	Catéchol et rutine de	Inhibition de la production de NO induite par le LPS	(Kazłowska et al. 2010)
	<i>Ecklonia cava</i>	Dieckol	Suppression de l'expression de iNOS et de COX-2. Inhibition de cytokines pro inflammatoires. Réduction de l'expression du facteur nucléaire κ B induite par le LPS	(Jung et al. 2009)
	<i>Ishige okamurae</i>	Diphloréthohydroxycarmalol	Régulation de l'expression de iNOS et de la COX-2 et activation de NF- κ B dans les cellules endothéliales et RAW 264.7.	(Heo et al. 2010)
Polysaccharide	Fucus vesiculosus	Fucanes	Inhibition de la production de NO et de PGE2 dans la microglie de BV2 stimulée par les LPS. Suppression de iNOS et COX-2	(Park et al. 2011)
	Porphyra yezoensis	Porphyrine	Inhibition de la production de NO induite par les LPS.	(Isaka et al. 2015)
Acides gras et dérivés lipidiques	Gracilaria verrucosa	Acide (E) -10-oxooctadec-8-énoïque et acide (E) -9-Oxooctadec-10-énoïque	Inhibition de la production de NO, TNF- α et l'IL-6 induite par des LPS en supprimant l'activation de NF-KB et la phosphorylation de STAT1.	(Lee et al. 2009)
		Acide (9E, 12E) -11-oxo-9,12-octadécadiénoïque et acide (8E, 11E) -10-oxooctadéca-8,11-diénoïque	Inhibition de la production de NO, d'IL-6 et de TNF- α induite par le LPS.	(Dang et al. 2008)
Terpénoïdes	<i>Eisenia bicyclis</i>	Fucostérol	Inhibition de la production de NO par le LPS. Suppression de l'expression iNOS et COX-2.	(Jung et al. 2013)
	<i>Laurencia glandulifera</i>	Néorogioltriol	Inhibition de la luciférase dans les RAW 264.7	(Chatter et al. 2011)
	Sargassum siliquastrum	La 9'-cis- (6'R) fucoxanthines, la 13-cis et la 13'-cis- (6'R) fucoxanthines	Inhibition de la production de NO, expression de iNOS et COX-2 et réduction de la production de PGE2 induite par le LPS	(Heo et al. 2012)
Protéines et peptides	P. yezoensis	Glycoprotéine	Inhibition la production de NO induite par le LPS. Réduction de l'expression de iNOS, COX-2, TNF- α et IL-1 β . Réduction de la formation de complexes de liaison de TLR4-IRAK4 et de TLR4-TRIF	(Shin et al. 2011)
	Pterocladia capillacea	Lectine	Inhibition de la migration des neutrophiles par inhibition des médiateurs inflammatoires.	(Silva et al. 2010)

Définition des objectifs :

C'est dans ce contexte bibliographique que le procédé de séparation et de purification fractionnée de biomolécules breveté en 2011 (FR2998894 (B1)) par la société SEPROSYS est utilisé (Baudouin et *al.* 2012). Ce procédé permet d'extraire et de séparer des biomolécules issues d'une **biomasse locale peu exploitée**, les macroalgues marines *Ulva* sp. en ne faisant intervenir **aucun solvant et aucun acide**. Ce procédé **facilement industrialisable** permet d'obtenir différentes fractions dont l'objectif majeur de ces travaux est de valoriser chacune de ces fractions (*figure 46*).

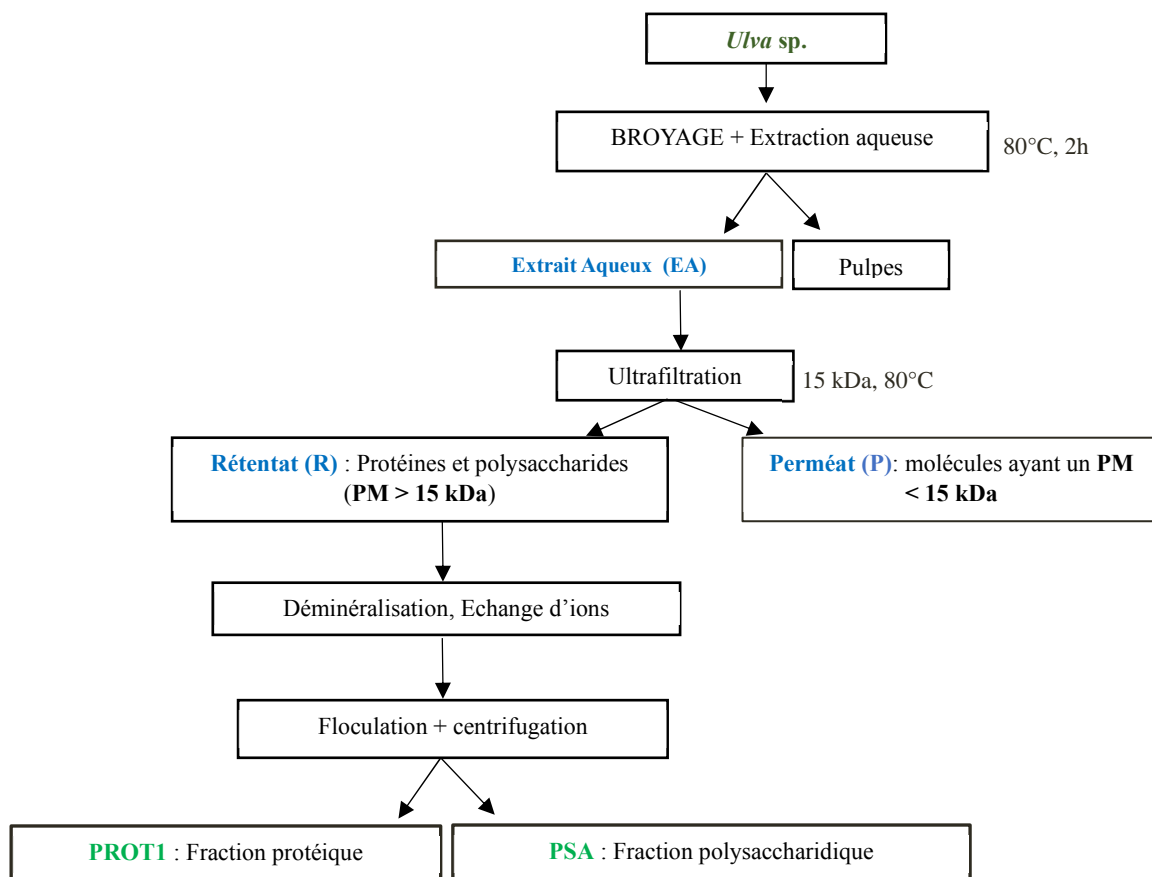


Figure 46 : Procédé de fractionnement de biomolécules issues de macroalgues vertes breveté par la société Seprosys.

Lors de notre étude bibliographique, nous avons montré que les **macroalgues vertes** constituaient une biomasse assez peu décrite et peu utilisée dans les domaines d'actions ciblées. C'est pour cela que notre choix s'est tournée vers l'utilisation de macroalgues vertes locales du genre *Ulva* sp. (*Ulva intestinalis* (UI) et *Ulva rigida* (UR)). Ces macroalgues vertes contiennent des biomolécules d'intérêts telles que les polysaccharides, les pigments et les protéines. **Les protéines issues de macroalgues marines** sont peu décrites et peu exploitées dans certains

domaines d'activités. En effet, peu de données démontrent l'implication de protéines algales ayant des activités dermocosmétiques (**anti-âge et anti-tâche**) mais aussi dans le domaine de la nutraceutique (**anti-inflammatoire**). L'extraction de ces protéines d'intérêts reste compliquée par le fait qu'il existe des interactions ioniques entre les polysaccharides complexes et les protéines des parois cellulaires, empêchant une extraction efficace de celles-ci (Mæhre et al. 2016). Lors des travaux antérieurs menés sur ce sujet, les faibles rendements protéiques et la nécessité d'augmenter la pureté avant filtration ont été mis en évidence, d'où la nécessité d'améliorer le procédé d'extraction et de purification SEPROSYS® (Adrien. 2016).

Dans un premier temps, l'objectif était d'**optimiser** le procédé SEPROSYS® afin d'extraire avec des rendements satisfaisants les biomolécules d'intérêts (polysaccharides et protéine). Une part importante de l'optimisation a été dédiée aux étapes de broyage (afin diminuer la granulométrie des particules d'algues et de libérer plus facilement les biomolécules) et de clarification (afin d'augmenter la pureté et d'éliminer les fines particules d'algues créées lors du broyage). De plus, le procédé nécessitait d'être **adapté à une échelle semi-industrielle** afin d'envisager une future commercialisation. Pour cela, la biomasse traitée est passée de 1 à 10 kg et la taille des installations a été modifiée. Au cours de ce procédé, une fraction polysaccharidique (**PSA**) contenant en majorité des polysaccharides (pureté > 85% (Adrien. 2016)) et une fraction protéique (**PROT1**) contenant en majorité des protéines ont été obtenues et caractérisées.

Dans un deuxième temps, l'objectif était de **produire** des fractions de bas poids moléculaire, peptidiques (par voie enzymatique) et oligosaccharidiques (par catalyse supportée) dans le cadre du projet Neuronalg. L'un des objectifs de ce projet étant la production de fractions de bas poids moléculaires susceptibles de traverser la barrière intestinale et/ou la barrière hémato-encéphalique, le poids moléculaire des fractions protéiques **PROT1** et des fractions polysaccharidiques **PSA** a été réduit afin d'obtenir des polymères potentiellement assimilables par l'organisme.

Dans un troisième temps, l'objectif était de **valoriser** les différentes fractions obtenues grâce au procédé optimisé SEPROSYS® provenant d'*Ulva intestinalis* (**UI**) et d'*Ulva rigida* (**UR**), dans le domaine **dermocosmétique** avec la mise en évidence du **potentiel anti-âge et anti-tâche** de certaines fractions, mais aussi dans le domaine **nutraceutique** dans le cadre du projet Neuronalg. Ce projet visait à démontrer que ces macroalgues peuvent représenter une alternative à l'utilisation de drogues conventionnelles pour la prévention de pathologies où il est indispensable de contrôler l'inflammation. C'est le cas des pathologies du système nerveux central comme les troubles de l'humeur, la dépression ou l'anxiété (Dinel et al. 2011). Dans notre société occidentale, l'obésité peut provoquer une inflammation de bas bruit en raison d'une production excessive de cytokines pro-inflammatoires, augmentant indirectement le niveau d'inflammation de l'organisme et du système nerveux périphérique. Cette augmentation peut induire, dans certains cas, des troubles cognitifs et dépressifs. C'est donc dans ce contexte que nous avons évalué le potentiel anti-inflammatoire des différentes fractions provenant d'*Ulva intestinalis* (**UI**) et d'*Ulva rigida* (**UR**) sur des macrophages murins, puis la capacité de certaines fractions à améliorer les troubles cognitifs et dépressifs de souris obèses.

III. Matériels et Méthodes

III.1 Fournisseurs des macroalgues utilisées

Les échantillons d'*Ulva rigida* ont été collectés tous les mois, au même endroit, dans les bassins de lagunage de la Ferme du Douhet située sur l'île d'Oléron, sur la côte Atlantique française (46°00'04.4"N 1°19'32.1"W). La Ferme Marine de Douhet (FMD) compte parmi les plus grandes écloséries de production d'alevins de daurade Royale (*Sparus aurata*) d'Europe.

Les échantillons d'*Ulva intestinalis* ont été collectés par la société Algorythme, jeune startup basée à Ars-en-Ré, sur l'Île de Ré (46°13'13.6"N 1°26'00.0"W). Elle est spécialisée dans la récolte et l'exploitation d'algues à usages alimentaire et cosmétologique, ainsi qu'un usage destiné à la recherche médicale.

III.2 Production des fractions

III.2.1 Procédé Seprosys ® :

La société **SEPROSYS** (Séparations Procédés Systèmes) est une société basée à La Rochelle spécialisée dans le développement de solutions d'extractions et de séparations de molécules. Au cours de l'année 2011, l'entreprise a développé un procédé de fractionnement de biomolécules issues d'*Ulva* sp. Ce procédé fait l'objet d'un brevet français ayant pour identifiant FR2998894 (B1) (Baudouin et *al.* 2012). Ce procédé innovant de « chimie verte » (dans le sens où il ne fait intervenir ni acide, ni solvant) a pour objectif de valoriser une biomasse jusqu'ici peu exploitée au niveau industriel : les macroalgues vertes de type *Ulva* sp.

Mode opératoire : 1 kg d'algues sèches sont trempées dans 20 L d'eau ultra-pure pendant 10 min à température ambiante. Les algues sont ensuite essorées et pressées à l'aide d'un cône en tissu, puis broyées dans 5 L d'eau ultra-pure à 80°C, jusqu'à l'obtention de particules de moins de 2 mm de diamètre. Les 5 L de broyat sont ensuite transférés dans une cuve thermostatée à 80°C contenant 10 L d'eau ultra-pure tempérée à 80°C (*figure 47*).

L'extraction est réalisée sous agitation constante à l'aide d'un agitateur à pales à une vitesse de rotation de 10 tours/min pendant 2 h. L'**extrait aqueux (EA)** obtenu à l'issue de la macération est soutiré de la cuve et filtré.

Une cinquième étape d'ultrafiltration est effectuée afin d'obtenir, d'une part, **un rétentat (R)** concentré contenant les molécules de plus grande taille, et d'autre part **un perméat (P)** contenant les éléments de plus petite taille, inférieure à 15 kDa. Cette étape d'ultrafiltration fait suite à l'extraction aqueuse où environ 13 litres de jus d'extraction sont récupérés. On utilise alors une unité d'ultrafiltration équipée d'une membrane de type Kerasep KBW 15 kDa de Novasep Process.

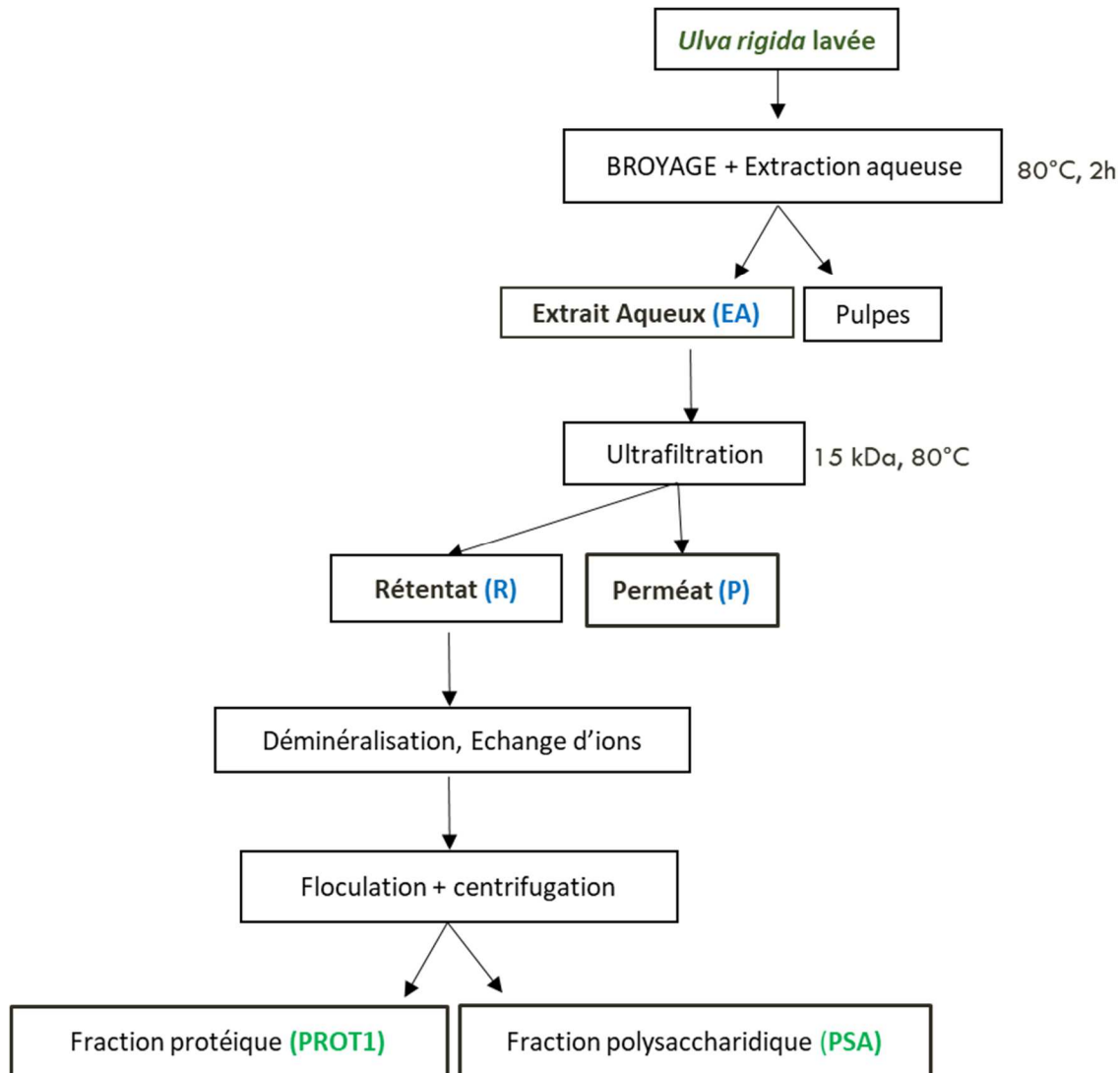


Figure 47 : Schéma du procédé de fractionnement de biomolécules issues de macroalgues vertes breveté par la société Seprosys.

La filtration est réalisée à 80°C, 5 bars et à un débit de circulation de 450 L/h, soit une vitesse de circulation de 5 m/s. La filtration est poursuivie jusqu'à obtenir un rétentat d'environ 4°B, qui est alors soutiré de l'unité. Le rétentat (1,5 L) est ensuite déminéralisé par passage sur une colonne contenant 100 mL de résine anionique forte de type Amberlite FPA 98 sous forme OH⁻, montée en série avec une colonne contenant 200 mL de résine cationique forte de type Amberlite IR 120 sous forme H⁺. La circulation s'effectue à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit de 2 BV/h pour la résine cationique (passage en boucle). Le produit déminéralisé est ensuite laissé à décanter dans une cuve à 80°C pendant 2 h.

Le surnageant purifié riche en polysaccharides sulfatés est alors séparé du culot protéique par centrifugation à 2150 g pendant 30 min. On obtient donc une fraction riche en polysaccharides sulfatés (PSA) et une fraction riche en protéines (PROT1).

III.2.2 Dépolymérisation de la fraction polysaccharidique

Les fractions polysaccharidiques provenant d'*Ulva rigida* (**PSA-UR**) et d'*Ulva intestinalis* (**PSA-UI**) ont été dépolymérisées d'après la méthode mise au point lors de la thèse précédente (Adrien, 2016) afin d'obtenir des fractions d'oligosaccharides de bas poids moléculaires appelées **PSB-UR** et **PSB-UI**. La fraction **PSA-UR** a été solubilisée à 25 mg. mL⁻¹ et dépolymérisée sur une résine AMBERLITE™ FPC23 H. La fraction **PSA-UI** a été solubilisée à 25 mg. mL⁻¹ et dépolymérisée sur une résine AMBERLITE™ 15 WET.

Le circuit de dépolymérisation comporte une pompe péristaltique et une colonne contenant 10 mL de AMBERLITE™ FPC23 H ou 15 WET. La solution polysaccharidique et la colonne sont maintenues à 80 ° C tout au long de l'expérience. La sortie a été réglée à 12 mL.min⁻¹. Toutes les heures pendant 24 heures, des aliquotes de 1 mL ont été collectées. La dépolymérisation a été suivie par HPL-SEC. Après avoir identifié le temps de dépolymérisation correspondant au poids moléculaire attendu, la production de la fraction a été préparée de manière similaire. La réaction de dépolymérisation a été interrompue au moment opportun pour chaque fraction et le pH a été neutralisé avec 0,1 M de NaOH. Les fractions ont ensuite été congelées à -80°C puis lyophilisées.

III.2.3 Dépolymérisation enzymatique de la fraction protéique

a. Digestion enzymatique : Utilisation du cocktail Flavourzyme

Les fractions protéiques **PROT1-UR** et **PROT1-UI** ont été solubilisées à 10 mg. mL⁻¹ et hydrolysées en utilisant le cocktail enzymatique très répandu dans l'industrie agroalimentaire : Flavourzyme® de chez Novozymes. Flavourzyme® est une préparation enzymatique contenant des protéases provenant d'*Aspergillus oryzae*. Elle contient huit enzymes : deux aminopeptidases, deux dipeptidyl peptidases, trois endopeptidases et une α -amylase (Merz et al. 2015)

Le protocole a été adapté à partir du brevet de Maugard et al. (2015). Les fractions ont été préalablement chauffées à 50 °C avant l'ajout du cocktail enzymatique. L'enzyme est ajoutée à t0h à hauteur de 4 % (v/v). Le mélange réactionnel est chauffé à 80°C durant 24 heures. Toutes les heures pendant 24 heures, des aliquotes de 1 mL ont été collectées. L'hydrolyse a été suivie par une chromatographie à haute perméabilité sur gel.

L'enzyme est inactivée, à chaque temps d'hydrolyse, en augmentant la température du milieu réactionnel à 95°C pendant 15 minutes afin de procéder à l'arrêt de la protéolyse par dénaturation thermique de l'enzyme. Une fois l'enzyme précipitée, la séparation de l'hydrolysate du mélange réactionnel est réalisée par centrifugation à une vitesse de 5000 rpm. Le culot est ensuite éliminé. Les hydrolysats sont ensuite filtrés sur des filtres 0.22 µm, congelés à - 80°C puis lyophilisés.

b. Digestion enzymatique : Utilisation de la trypsine

Standards, réactifs et échantillons :

- Trypsine Bovine Pancréas (Sigma Aldrich, T1426)
- Acide formique (Sigma Aldrich, F0507)
- Acétonitrile (Sigma Aldrich, 271004)

Mode opératoire :

Les fractions protéiques **PROT1-UI** et **PROT1-UR** ont subi une digestion trypsique durant 24h, à 38°C dans un tampon Tris HCl 0,05 M, pH8, [trypsine] à 500 µg/ml. Les peptides obtenus ont été ensuite séparés et analysés par UHPLC-MSE. Les peptides ont été élués sur une colonne BEH C18 (ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 100 mm, 1/pk) chauffée à 25°C avec le même gradient utilisé précédemment : Eau + 0.1% acide formique/ Acétonitrile + 0.1% acide formique. Les peptides obtenus sont ensuite comparés aux peptides de la banque de donnée **UNIPROTKB** (critère de sélection : Algues vertes-*Ulva*). Cette base de données permet de retrouver l'identité de la protéine contenant les séquences peptidiques libérées lors de l'hydrolyse trypsique.

III.3 Caractérisation biochimique et structurale

III.3.1 Dosages biochimiques

a. Dosage colorimétrique des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux est effectué par la méthode de phénol /acide sulfurique introduite par Dubois et *al.* (1951). Les liaisons glycosidiques sont hydrolysées, à chaud, en présence d'acide sulfurique concentré et la déshydratation des unités osidiques conduit à la formation de composés furfuriques. Ces derniers interagissent avec les composés phénoliques

(phénol) par condensation pour former des composés de coloration orange-jaune. Leur apparition est suivie en mesurant l'augmentation de la densité optique à 485 nm.

Standards, réactifs et échantillons :

- Rhamnose (Sigma-Aldrich) à 1 mg. mL⁻¹.
- Solution de phénol 5 %, Acide sulfurique 96 % (Sigma-Aldrich)
- Échantillon à analyser à 1 mg. mL⁻¹

Mode opératoire :

Dans des vials en verre, 40µl de la solution à doser sont ajoutés à 40µl de phénol 5% et à 200µl d'acide sulfurique pur. Le mélange réactionnel est incubé durant 30 minutes, à 90°C et dans l'obscurité. Les échantillons sont, par la suite, refroidis dans la glace. Les densités optiques sont ensuite lues à 485nm dans une microplaque 96 puits. Une gamme de Rhamnose allant de 0 à 1 mg. mL⁻¹ a été réalisée.

b. Dosage colorimétrique des acides uroniques

Le dosage des acides uroniques est inspiré de la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) modifiée par (Filisetti-Cozzi *et al.* 1991).

Standards, réactifs et échantillons :

- Acide glucuronique (Sigma-Aldrich G5269) à 1 mg. mL⁻¹.
- Solution de tétraborate de sodium à 0.075 M dilué dans de l'acide sulfurique 96 %, solution de méta-hydroxydiphényle (mHDP) à 0,15 % et solution d'acide sulfamique à 4M
- Échantillon à analyser à 1 mg. mL⁻¹

Mode opératoire :

Dans des vials en verre, 200 µl de la solution à doser sont ajoutés à 20 µl d'acide sulfamique à 4M. Le mélange réactionnel est vortexé avant l'ajout de 1,2 ml de tétraborate de sodium à 0.075M. La totalité est ensuite vortexée et incubée durant 20 minutes, à 80°C et dans l'obscurité. Les mélanges réactionnels sont refroidis dans un bain de glace avant l'ajout de 80 µL de mHDP à 0,15%. Après une forte agitation, les densités optiques sont ensuite lues à 525 nm dans une microplaque 96 puits. Une gamme d'acide glucuronique allant de 0 à 1 mg. mL⁻¹ a été réalisée.

c. Dosage colorimétrique des protéines selon la méthode de Lowry

Cette méthode a été développée par Lowry *et al.* (1951) qui ont combiné une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret.

Standards, réactifs et échantillons :

- Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich G5269).
- Réactif de Lowry : tartrate double sodium potassium à 2%, sulfate de cuivre à 1% et carbonate de sodium dans 2% dans NaOH à 0,1M. (1/1/100)
- Réactif de Folin :
- Échantillon à analyser à 1 mg. mL⁻¹

Mode opératoire :

Dans une microplaque 96 puits, 25 µl de solution à doser sont ajoutés à 75 µl de réactif de Lowry avant une incubation de 20 min à température ambiante et dans l'obscurité. Puis 125 µl de réactif de Folin (dilué 1/20) sont ajoutés au mélange réactionnel. Une seconde incubation de 30 min, à température ambiante et à l'obscurité, est nécessaire avant une lecture à 750 nm. Une gamme étalon de BSA (Bovine Sanguin Albumine) de 0 à 0,5 mg. mL⁻¹ a été réalisée.

d. Détermination du taux d'azote par la méthode du Kjeldahl

Ce dosage comprend deux étapes selon la méthode décrite par Kirk (1950). La première est une étape de minéralisation. Le but est de dégrader la matière organique azotée sous la forme de sel d'ammonium.

Équation de minéralisation : Matière organique → NH₄⁺

Le pH acide permet au sel d'ammonium d'apparaître sous sa forme acide de l'ammonium NH₄⁺. La dégradation de la matière organique azotée se fait à l'aide d'un catalyseur (du sulfate de cuivre et du sulfate de potassium), de l'acide sulfurique à haute température (380 °C). La deuxième étape est une étape de distillation de l'ammonium par l'ajout de soude : on cherche à transformer l'ammonium sous sa forme volatile, l'ammoniac.

Equation de la distillation : NH₄⁺ + NaOH → Na⁺ + H₂O + NH₃

Standards, réactifs et échantillons :

- Comprimé Catalyseur de Kjeldahl (Sigma-Aldrich 1184690250) ajouté dans chaque matra.
- NaOH (Sigma-Aldrich 795429), solution d'acide borique (Sigma-Aldrich B6768), solution d'acide chloridrique 37% (Sigma-Aldrich 258148)
- Urée (Sigma-Aldrich 1.08488)

Mode opératoire :

Pour la minéralisation, 1 g de chaque échantillon est ajouté dans des matras, avec 2 comprimés du catalyseur. Un matra contenant uniquement les comprimés est utilisé à blanc et un autre matras contenant une quantité connue d'urée est utilisée comme témoin. Ensuite, 10 ml d'acide sulfurique sont ajoutés dans chaque matra. Les solutions sont ensuite chauffées pendant 2

heures à environ 400 ° C. Après la minéralisation, la distillation est effectuée pendant 6 minutes après addition de 50 ml de NaOH à 30% et de 50 ml d'eau distillée. Le liquide est ensuite recueilli dans une solution d'acide borique (4%, pH 4,65) et titré avec de l'HCl 1M.

e. Dosage colorimétrique des sulfates

La quantité de sulfates liés aux polysaccharides a été déterminée par l'utilisation de la méthode de dosage colorimétrique développée par Jaques et al. (1968). Dans un milieu aqueux, le 3- amino-7-(diméthylamino) phénothizin-5-ium chloride (Azure A) va complexer les groupements sulfates. Le complexe chromophore émet une couleur violette mesurable au spectrophotomètre à 535nm.

Standards, réactifs et échantillons :

- Dextran sulfaté à 17% (Sigma-Aldrich D6049) à 1 mg. mL⁻¹.
- Solution d'Azure A (Sigma-Aldrich A6270) à 10 mg/L
- Échantillon à analyser à 1 mg. mL⁻¹

Mode opératoire :

Dans un puit sur une microplaque 96 puits, 20 µL d'échantillon (dilué si nécessaire) sont mélangés avec 200 µL de solution aqueuse d'Azure A à 10 mg. mL⁻¹. La concentration des groupements sulfates est déterminée à partir de la droite linéaire de la gamme étalon réalisée avec le Dextran sulfaté à 17% (0, 10, 20, 30, 40, 50 µg. mL⁻¹).

f. Dosage colorimétrique des lipides

A chaud en milieu sulfophosphorique, les lipides développent avec la vanilline une coloration rose dosable au spectrophotomètre. Cette réaction a été mise en évidence par Chabrol et Charonnat (1937).

Standards, réactifs et échantillons :

- Chloroforme (Sigma-Aldrich 1.02442) et Hexane (Sigma-Aldrich 270504) en solution (2/1 v/v)
- Acide sulfurique, 96 % (Sigma-Aldrich)
- Vanilline (Sigma-Aldrich) et acide phosphorique à 68% (Sigma-Aldrich)
- Gamme étalon à partir d'une huile végétale allant de 0 à 5 mg. L⁻¹
- Echantillon à analyser à 1 mg. mL⁻¹

Mode opératoire :

Dans des vials en verre, 50 µL d'échantillon ou de gamme étalon + 100 µL de solvant chloroforme-hexane sont évaporés à 90°C. Ensuite, 100 µL d'acide sulfurique à 96 %. On incube à 90°C sont ajoutés pendant 10 minutes. Les vials en verre sont refroidit dans un bain de glace afin de faire diminuer la température.

Une première lecture à 540 nm est nécessaire afin de s'affranchir du bruit de fond causé par le solvant. Par la suite, 100 μL de vanilline diluée dans de l'acide phosphorique (0.5 mg. mL^{-1} dans de l'acide phosphorique à 68%) sont ajoutés dans les vials en verre. Ils sont ensuite incubés pendant 5 minutes à température ambiante et lecture de l'absorbance à 540 nm dans une microplaque 96 puits.

g. Dosage colorimétrique des polyphénols

Le dosage des polyphénol a été effectué en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968).

La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les différentes fractions.

Standards, réactifs et échantillons :

- Réactifs de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich)
- Carbonate de sodium (Sigma-Aldrich) à 20 %
- Acide gallique (Sigma-Aldrich), gamme étalon allant de 0 à 0,5 mg. mL^{-1}

Mode opératoire :

Dans des tubes à hémolyse en verre, un volume de 200 μL de chaque extrait ou gamme étalon a été ajouté, avec un mélange de 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu dilué 10 fois. On ajoute ensuite 800 μL d'une solution de carbonate de sodium à 20 %. Les tubes sont agités et incubés pendant 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité. L'absorbance est lue à 765 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0 à 0.5 mg. mL^{-1}).

III.3.2 Electrophorèse SDS-PAGE

Une électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis) est réalisé dans un système discontinu d'après la méthode décrite par Brunelle et Green (2014). Les différents échantillons sont déposés au-dessus d'un gel de polyacrylamide composé d'un gel concentration 4.5% et d'un gel de séparation 12.5 à 17 % (10 x 12 x 0,15 cm).

Standards, réactifs et échantillons :

- Acrylamide/Bisacrylamide (Sigma Aldrich A0925), Trizma-Base (Sigma Aldrich 93362), Dodécyl sulfate de sodium (Sigma Aldrich L3771), persulfate d'ammonium (Sigma Aldrich A3678), tétraméthyléthylènediamine (Sigma Aldrich T9281)

- Precision Plus Protein™ Standards All Blue (Bio rad)
- Page Blue™ Protein Staining Solution (Thermo Fischer)

Mode opératoire :

Afin d'obtenir un gel de séparation à 17% de polyacrylamide, 3,125 ml d'eau ultrapure, 4,275 ml d'acrylamide, 2,5 ml de tampon Tris 1,5 M à pH 8,8, 0,1 ml de solution de dodécyl sulfate de sodium (SDS) à 10%, 50 µL de solution de persulfate d'ammonium (APS) et 10 µL de tétraméthyléthylènediamine (TEMED) sont mélangés.

Afin d'obtenir le gel de séparation à 12.5 % de polyacrylamide, 2,3 ml d'eau ultrapure, 3,40 ml d'acrylamide, 2,5 ml de tampon Tris 1,5 M à pH 8,8, 0,1 ml de solution de dodécyl sulfate de sodium (SDS) à 10%, 50 µL de solution de persulfate d'ammonium (APS) et 10 µL de tétraméthyléthylènediamine (TEMED) sont mélangés

Afin d'obtenir le gel de séparation à 4% de polyacrylamide, 6,425 ml d'eau ultrapure, 0,975 ml d'acrylamide, 2,5 ml de tampon Tris 0,5 M à pH 6,8, 0,1 ml de solution de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 10%, 50 µL de solution de persulfate d'ammonium (APS) et 10 µL de tétraméthyléthylènediamine (TEMED) sont mélangés.

Un marqueur *Precision Plus Protein™ Standards All Blue* allant de 10 à 250 kDa est déposé dans le premier puit . Les échantillons à déposer sont dilués dans du tampon de charge 1X (à partir d'une solution à 4X contenant 500 mM Tris-HCl pH 6,8, glycérol (vol/vol) 40%, β-mercaptoéthanol 20%, SDS 8% (p/v), bleu de Bromophénol 0,4%) puis dénaturés pendant 5 min à 100°C. 3 µL du marqueur de 10-250 kDa et 20 µL de chaque échantillon sont déposés dans les puits. L'électrophorèse est réalisée dans un tampon de migration (Tris 25 mM ; Glycine 192 mM ; SDS 0,1% p/v), à 25 mA jusqu'à ce que le front de migration arrive en bas du gel. L'électrophorèse est réalisée dans le système Mini-PROTEAN Tetra de BIO-RAD, sous 90 volts, pendant 2h30. Après un lavage avec de l'eau ultrapure, le gel est coloré par le bleu de Coomassie *Page Blue™ Protein Staining Solution* pendant 30 minutes. Le gel est ensuite lavé 3 fois avec de l'eau ultrapure durant 30 minutes puis si besoin, durant une nuit sous agitation lente à température ambiante. Les images sont obtenues à l'aide de Gel Doc EZ Imager de BIO-RAD, avec le logiciel Image Lab. 4.1.

III.3.3 Analyses chromatographique et spectrométrie

a. Analyses HPLC/RID des différentes fractions polysaccharidiques

Les analyses structurales des extraits polysaccharidiques (**PSA-UR, PSA-UI, PSB-UR** et **PSB-UI**) ont été effectuées sur un système HPLC Agilent technologies 1100 LC / RID utilisant successivement deux colonnes de chromatographie à exclusion : TSK gel 5000 PW (L × I.D. 30 cm × 7.5 mm) et TSK gel 4000 PW (L × I.D. 30 cm × 7.5 mm) maintenues à 30 °C. Le tampon d'éluion est une solution d'acétate d'ammonium 0,1 M (Adrien Dit Richard

2016). 20 μL d'extrait à 1 mg. mL^{-1} ont été injectés, après avoir été préalablement filtrés. Le débit d'élution a été fixé à 1 mL / min. Les produits ont été détectés et quantifiés par réfractométrie différentielle en utilisant le logiciel HP Chemstation hors ligne pour le traitement. La courbe standard a été réalisée avec des standards de Pullulan compris entre 1,3 et 348 kDa. Les profils HPLC obtenus pour chacun des standards de Pullulan utilisés ont été reportés sur le chromatogramme ci-dessous (*figure 48*). Le poids moléculaire moyen en nombre (M_n), le poids moléculaire moyen en poids (M_w), le degré de polymérisation (DP) et l'indice de polydispersité (I) ont été calculés comme suit (Ye et al, 2009) :

$$M_n = (\sum N_i \times M_i) / \sum N_i$$

$$M_w = (\sum N_i \times M_i^2) / (\sum N_i \times M_i)$$

$$I = M_w / M_n$$

où N_i est le nombre de moles d'espèces polymères, M_i le poids moléculaire des espèces polymères et M_0 le poids moléculaire des unités monomères.

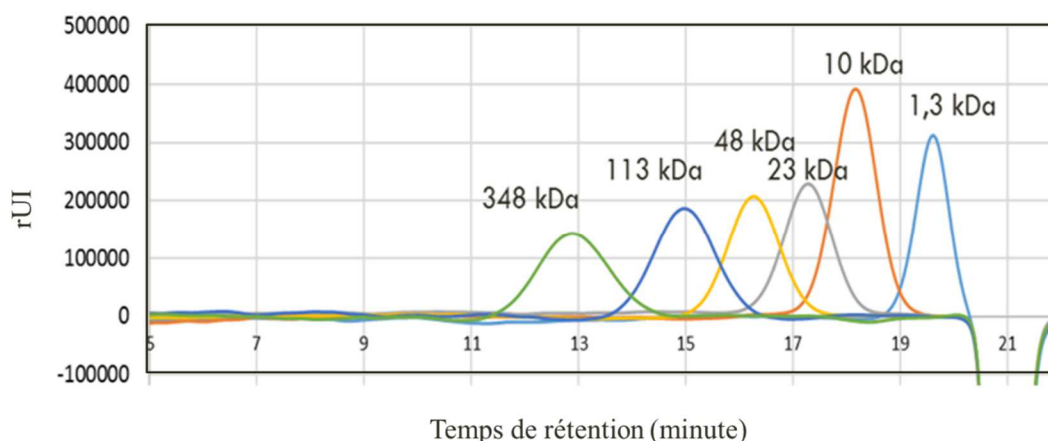


Figure 48 : Chromatogramme HPLC/RID avec des standards de poids (Pullulan) obtenu avec des colonnes Gel Perméation TSK Gel 5000-4000PW (débit : 1ml/min)

b. Analyses HPLC/UV des différentes fractions protéiques et peptidiques

Les analyses structurales des fractions (**PROT1-UR**, **PROT1-UI**, **PROT2-UR** et **PROT2-UI**) ont été effectuées à partir de la méthode mise au point par Richter et al. (1983). Elles ont été effectuées sur un système HPLC Agilent technologies 1100 LC / UV en utilisant une colonne de chromatographie à exclusion contenant des particules de 10 μm : TSK gel 3000 SW (L \times I.D. 60 cm \times 7.5 mm) maintenue à 30 ° C. Le tampon d'élution utilisé est un tampon phosphate 0.1 M contenant 0.3% de NaCl. 30 μL de chaque extrait à 1 mg. mL^{-1} ont été injectés. Le débit d'élution a été fixé à 1 mL / min. Les analyses ont été effectuées dans le domaine de l'UV à 210 nm. Afin de suivre la diversité des poids moléculaires au cours du temps, nous avons utilisé une gamme avec des composés allant de 669 kDa et 1 kDa, en nous basant sur la méthode décrite par Richter et al. (1983) (*figure 49*).

	PM (kDa)
Blue Dextran	2000
Thyroglobuline	669
Apoferitine	443
β -amylase	200
Alcool DSH	150
Albumine	66
Carbonique anhydrase	29
α -lactalbumine	14,2
cytochrome c	12
insuline	3
α -casomorphine 1,4	1

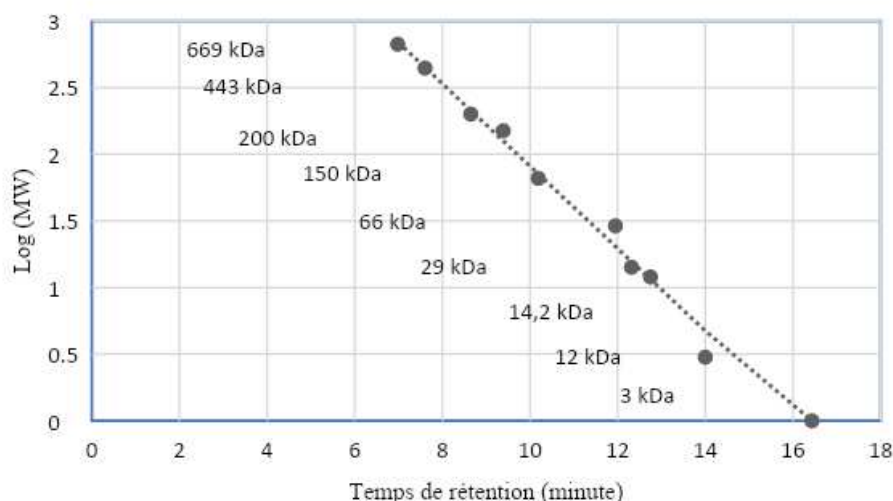


Figure 49 : Gamme de calibration en chromatographie gel perméation/UV et standard de poids moléculaire. Suivie du poids moléculaire moyen (1 à 669 kDa)

c. Analyses des fractions protéiques en spectrométrie UPLC-ESI-Q-TOF

Afin de caractériser les peptides présents, les fractions **PROT2-UR** et **PROT2-UI**, ainsi que les **hydrolysats tryptiques** ont été analysées par spectrométrie de masse (ESI-Q-TOF) après séparation par UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography).

Ce système est composé de :

- **Une UPLC** couplée au spectromètre de masse, ce qui permet une séparation des biomolécules présentes dans les fractions.
- **Une source d'électronébulisation ESI** : Les fractions sont introduites diluées dans un capillaire. Le champ électrique intense à la sortie de ce capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées traversant simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur quadripôle.
- **Un couplage de 2 analyseurs** : un analyseur quadripôle (Q) et un temps de vol (TOF).

L'analyseur quadripôle est un analyseur à balayage qui utilise la stabilité de la trajectoire des ions entre les barres pour les séparer en fonction de leur rapport m/z . Le second analyseur TOF mesure le temps que mettent les ions à parcourir la distance du tube de vol après avoir été accélérés par un champ électrique. Un signal au niveau du détecteur à un temps donné du balayage correspond à un m/z donné. C'est un analyseur de haute résolution qui permet de mesurer la masse exacte et de déterminer la formule brute d'un composé détecté. Les analyses ont été réalisées en utilisant le système Acquity UPLC H-Class (Waters, Milford, USA) couplé au spectromètre de masse Xevo G2 S Q-TOF (figure 50) équipé d'une source d'ionisation electrospray (Waters, Manchester, United Kingdom).



Figure 50 : Système Acquity UPLC H-Class (Waters, Milford, USA) couplé au spectromètre de masse Xevo G2 S Q-TOF, présent sur la plateforme d'Analyse Haute Résolution de Biomolécules du laboratoire LIENSs

La séparation chromatographique a été effectuée sur une Colonne Acquity UPLC HSST3, (150 mm x 2,1 mm x 1,7 μm) maintenue à une température de 25°C. Les phases mobiles (eau/acétonitrile + 0,1% acide formique) utilisées forment un système d'élution correspondant à un gradient en fonction du temps (tableau 9).

Le volume d'injection est de 10 μL . Le système d'auto-échantillonnage est maintenu à une température de 4°C. Le débit d'élution est de 0,3 ml/min.

Les paramètres utilisés pour les analyses de spectrométrie de masse sont :

- **ESI Mode Positif** (50-2500 m/z), en mode centroïde, fréquence de scan 0,5 s/scan
- **Tension du capillaire** : 3 kV ; Tension du cône : 35 V
- **Température de la source** : 120°C
- **Température de désolvatation** : 500°C
- **Débit de gaz au niveau du cône** : 50 L/h
- **Débit de gaz de désolvatation** : 300 L/h
- **Lockmass** : Leucine Enképhaline ($M = 555,62 \text{ Da}$, 1 ng. μL^{-1}) avec un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$
- **Analyse MS/MS** : basée uniquement sur l'intensité des ions au cours du run UPLC
 - MS bascule vers MS/MS si l'intensité d'un ion dépasse 500 000/s
 - MS/MS rebasculée vers MS quand l'intensité de l'ion chute en dessous de 10 000 (ou au bout de 10 s)
 - Energie de collision : rampe de 15 à 35 eV

Tableau 9 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation des fractions par UPLC

Temps (min)	Eau + 0,1% acide formique	Acétonitrile + 0,1% acide formique
0	100	0
2	100	0
2.5	99	1
3	99	1
4	97	3
5.5	97	3
8.5	95	5
10	95	5
15	90	10
18	90	10
22	80	20
27	80	20
30	70	30
34	70	30
36	0	100
38	0	100
40	100	0
45	100	0

Les acquisitions et le traitement des données ont été réalisés en utilisant le logiciel « Mass Lynx Version 4.1 » de Waters. Le module « Bio lynx » utilisé a permis de proposer et de vérifier la séquence des peptides après fragmentation MS/MS.

d. Détermination de la composition en acides aminés

Une méthode permettant de quantifier les acides aminés présents au sein d'un échantillon a été mise au point. Cette méthode permet de doser les acides aminés totaux et/ou libres en utilisant un système Acquity UPLC H-class (Waters corporation, Milford, Etats-Unis) couplé à un spectromètre de masse haute résolution Xevo G2-S Q-TOF (Waters corporation, Milford, Etats-Unis). La concentration en acides aminés présents dans chaque échantillon a été calculée grâce à une gamme d'étalonnage. Les acides aminés ont été injectés à des concentrations allant de 0,5 à 25 mg/L, solubilisés et dilués dans H₂O/MeOH/acide formique (95:5:0,5, v/v/v). Les conditions chromatographiques utilisées sont données dans le tableau suivant :

Temps (min)	Solvant A H ₂ O/MeOH/acide formique (95:5:0,5, v/v/v) (%)	Solvant B H ₂ O/MeOH/acide formique (50:50:0,5, v/v/v) (%)
0	100	0
2	100	0
7	30	70
8	100	0
13	100	0

Les paramètres utilisés pour les analyses de spectrométrie de masse sont :

- **ESI Mode Positif** (50-1200 m/z), en mode centroïde, fréquence de scan 0,5 s/scan
- **Tension du capillaire** : 3 kV ; Tension du cône : 35 V
- **Température de la source** : 120°C
- **Température de désolvatation** : 500°C
- **Débit de gaz au niveau du cône** : 50 L/h
- **Débit de gaz de désolvatation** : 300 L/h
- **Lockmass** : Leucine Enképhaline (M = 555,62 Da, 1 ng. μL^{-1}) avec un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$
- **Analyse en mode MS^E** :
 - Fonction 1, basse énergie : 5 eV
 - Fonction 2, haute énergie : rampe de 10 à 30 eV

Le logiciel Chromalynx nous a permis de détecter et de doser les acides aminés selon leur m/z, selon la masse des ions ammoniums et selon leur temps de rétention. L'intégration des pics a été vérifiée manuellement. Afin de déterminer la composition en acides aminés libres, les différents échantillons ont été injectés à 2,5 mg.ml⁻¹. En ce qui concerne la détermination des acides aminés totaux présents dans un échantillon, les différentes fractions ont subi une hydrolyse totale : 10 mg de matière première dilués dans 1 ml d'HCl 1M ont été chauffés à 100°C pendant 2 h. Les échantillons ont ensuite été neutralisés à la soude (1 M) puis filtrés sur 0,22 μm . Le chromatogramme et les temps de rétention obtenus pour chaque acide aminé sont présentés ci-contre (*tableau 10*).

Tableau 10: Temps de rétention et coefficients de corrélations obtenus pour chaque acide aminé lors de l'injection sur colonne HSS T3 (2,1 x 150 mm, 1,7 μm) débit 0,3 ml/min, 25 °C.

Acides aminés	Temps de rétention	Linéarité en mg/L	Coefficient de corrélation
<i>Lysine (Lys)</i>	1,06 min	1,5-25	0,9831
<i>Histidine (His)</i>	1,09 min	1-25	0,9836
<i>Arginine (Arg)</i>	1,11 min	1-25	0,9856
<i>Cystéine (Cys)</i>	1,11 min	1,5-25	0,9835
<i>Glycine (Gly)</i>	1,13 min	Glycine impossible à doser par manque de linéarité	
<i>Serine (Ser)</i>	1,13 min	2-12,5	0,9785
<i>Asparagine (Asn)</i>	1,13 min	1,5-17,5	0,9871
<i>Acide aspartique (Asp)</i>	1,15 min	5-12,5	0,9849
<i>Glutamine (Gln)</i>	1,15 min	1,5-25	0,9873
<i>Alanine (Ala)</i>	1,17 min	5-12,5	0,8043
<i>Thréonine (Thr)</i>	1,17 min	5-17,5	0,9771
<i>Acide Glutamique (Glu)</i>	1,19 min	1,5-25	0,9836
<i>Proline (Pro)</i>	1,26 min	1,5-25	0,9883
<i>Valine (Val)</i>	1,66 min	5-17,5	0,9897
<i>Méthionine (Met)</i>	1,85 min	1,5-25	0,9844
<i>Tyrosine (Tyr)</i>	2,38 min	1,5-25	0,9763
<i>Isoleucine (Ile)</i>	2,97 min	1,5-25	0,9903
<i>Leucine (Leu)</i>	3,26 min	1-25	0,9911
<i>Phénylalanine (Phe)</i>	5,25 min	1-25	0,9833
<i>Tryptophane (Trp)</i>	6,94 min	1,5-25	0,9742

III.3.4 Fractionnement des hydrolysats par ultrafiltration

Afin de déterminer les répartitions des peptides en termes de poids moléculaire dans chaque hydrolysat, les hydrolysats peptidiques sont filtrés sur différentes membranes de filtration ayant des seuils de coupure différents (3 kDa, 10 kDa et 50 kDa).

Standards, réactifs et échantillons :

- Membrane : *Amicon Ultra 0.5 mL centrifugal filters* 3 kDa, 10 kDa, 50 kDa (Sigma Aldrich).

Mode opératoire : 500 μ L de chaque hydrolysat, préalablement filtré sur des filtres 0.22 μ m, ont été insérés dans l'*Amicon ultra 0.5 ml* et centrifugés à 14 000 xg pendant 25 minutes, 15 minutes et 5 minutes respectivement pour les membranes de séparation 3 kDa, 10 kDa et 50 kDa. Cette étape a permis de récupérer le perméat contenant les molécules ayant un poids moléculaire en dessous de 3 kDa, 10 kDa et 50 kDa en fonction de la membrane utilisée. Une fois le filtre retourné, une centrifugation à 1000 xg pendant 2 minutes pour toutes les membranes permet de récupérer le rétentat contenant les molécules ayant un poids moléculaire au-dessus de 3 kDa, 10 kDa et 50 kDa en fonction de la membrane utilisée. La teneur en protéines a ensuite été dosée en utilisant la méthode de Lowry (*figure 51*).

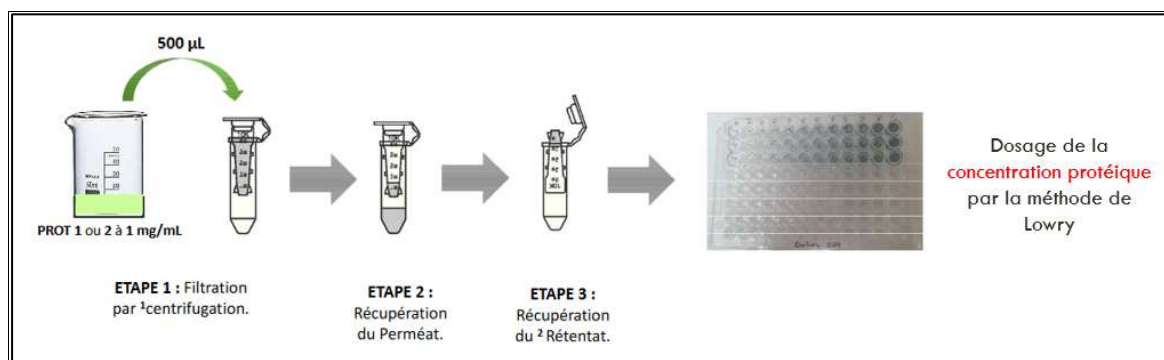


Figure 51: Schéma récapitulatif de la procédure à suivre afin de fractionner les différents hydrolysats par ultrafiltration.

III.4 Activités biologiques et culture cellulaire

III.4.1 Lignées cellulaires

La lignée de cellules **B16F0** (mélanocytes murins, ATCC-CRL-6322) est une lignée de cellules immortalisées issue d'un mélanome de souris, et provient de American Type Culture Collection (ATCC).

La lignée cellulaire **RAW 264.7** (macrophage murin, ATCC-TIB-71) est une lignée de macrophages murins immortalisée provenant d'une tumeur induite par le virus de la leucémie murine d'Abelson et provenant de American Type Culture Collection (ATCC). Les deux lignées cellulaires sont cultivées dans du DMEM contenant 10 % de SVF et 1% de pénicilline-streptomycine.

Les lignées fibroblastiques **CDD 1059Sk** et **CDD 1090Sk** (fibroblastes humains, ATCC® CRL-2106™, ATCC® CRL-2072™) sont des lignées fibroblastiques humaines provenant de American Type Culture Collection (ATCC). Les deux lignées cellulaires sont cultivées dans du milieu Eagle essentiel minimal (EMEM) additionné de 10% de SVF et 1% d'antibiotiques.

Les cellules ont été cultivées dans un incubateur humidifié à température contrôlée (37°C) avec 5% de CO₂. Elles ont étéensemencées dans des flasques de culture ventilées en surface de 75 cm² et elles ont été trypsinées lorsqu'elles étaient à plus de 80% de confluence. Le milieu de culture a été renouvelé tous les 2 à 3 jours. Les cellules ont été utilisées après le 4^{ème} passage pour les expériences. Le sérum de veau fœtal (SVF) et le milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) proviennent de Eurobio. Les autres produits proviennent du fournisseur Sigma Aldrich.

III.4.2 Evaluation de l'impact des extraits sur la viabilité cellulaire

a. Test de viabilité cellulaire : Test MTT

Le test MTT a été utilisé selon la méthode décrite par Mosmann (1983). Le MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl] -2,5-diphényltétrazolium) est un substrat chromogène réduit par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. Le principe du test repose sur l'utilisation d'un sel de tétrazolium qui est réduit en cristaux de formazan par des enzymes intracellulaires des cellules vivantes. La quantité de cristaux de formazan produite est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules (*figure 52*). Ce composé insoluble de

couleur violette est solubilisé dans du DMSO pour permettre son dosage spectrophotométrique à 570 nm.

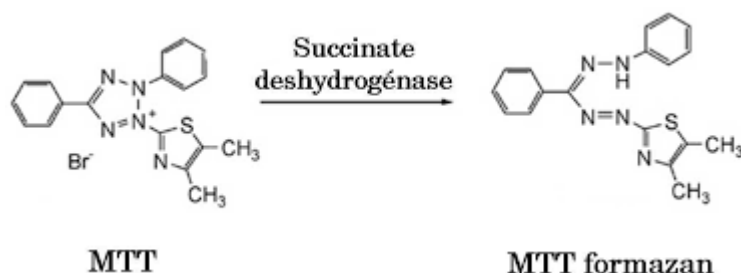


Figure 52 : Réaction biochimique de la transformation du MTT en cristaux de formazan (violet).

Mode opératoire : Les cellules sontensemencées 24 heures dans des plaques de 96 puits à 5.10^4 cellules/mL (CDD 1059/1090), à $2,5.10^3$ cellule/mL (B16F0) et à $7,5.10^4$ cellule/mL (RAW 264.7) pour leur permettre d'adhérer. Ensuite, elles sont traitées avec des concentrations croissantes d'extraits à tester dans du milieu complet. Les microplaques sont incubées 24 heures et 48 heures à 37°C . 25 μL de MTT sont ajoutés dans chaque puits et les microplaques sont incubées pendant 4 heures à 37°C .

Le milieu est ensuite éliminé et 200 μL de diméthylsulfoxyde (DMSO) est ajouté dans chaque puits pour dissoudre les cristaux violets de formazan produits. Les microplaques sont ensuite incubées pendant 20 minutes. La lecture d'absorbance s'est faite à 570 nm en utilisant un lecteur de microplaques.

b. Test de mortalité cellulaire : Test de Lactate déshydrogénase (LDH)

La cytotoxicité des cellules a été évaluée par la mesure de la LDH (enzyme intracellulaire) libérée dans le milieu de culture par des cellules endommagées d'après l'adaptation du protocole décrit par Holmgren et al. (2015) (figure 53).

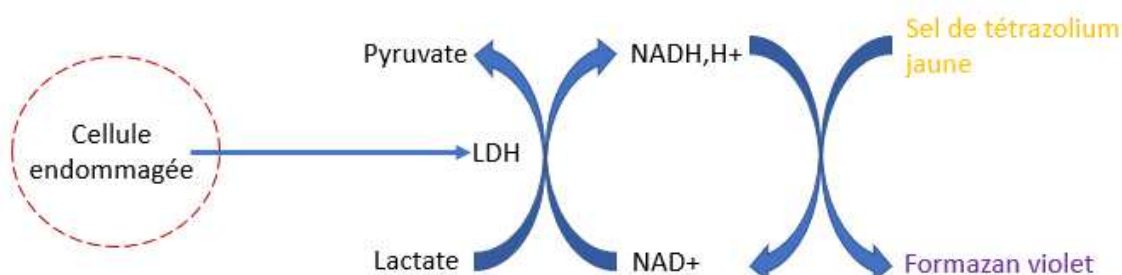


Figure 53 : Réaction biochimique de la transformation des sels de tétrazolium (jaune) en cristaux de formazan (violet).

Mode opératoire : Les cellules sontensemencées 24 heures dans des plaques de 96 puits à 5.10^4 cellules/mL. Les cellules cultivées sont traitées ou non avec les différents extraits, dans du milieu contenant 1% d'antibiotique, puis incubées à 37°C pendant 48 heures. A la fin de l'incubation, la cytotoxicité engendrée par les différents traitements est déterminée en utilisant le kit de dosage de l'activité de la LDH (Sigma Aldrich, MAK066-1KT) en suivant les instructions du fabricant. Les microplaques sont centrifugées à 250 xg pendant 10 minutes. 100 µL de surnageant sont placés dans une nouvelle microplaque puis 100 µL de réactif LDH ont été ajoutés dans chaque puit. La microplaque est incubée 30 minutes à 15-25 °C. La lecture d'absorbance s'est faite à 750 nm en utilisant un lecteur de microplaques.

III.4.3 Détermination de l'activité anti-âge

a. Dosage du collagène

La production de collagène a été mesurée en utilisant la procédure de coloration rouge Sirius selon la méthode décrite par Ravelojaona (2008).

Mode opératoire : 500 µL de suspension cellulaire ont été déposées dans des plaques 24 puits à 5.10^4 cellules /ml. Après 2 heures, les échantillons à tester, dilués dans du milieu sans SVF, sont mis au contact des cellules aux concentrations adéquates. Après 24 heures, les surnageants cellulaires sont prélevés et conservés au congélateur (-80°C) (*figure 54*).

1. Les puits sont lavés 2 fois avec du PBS.
2. Les cellules sont ensuite fixées pendant 1 heure avec 1 mL de solution de Bouin à température ambiante.
3. Après la fixation, la solution de Bouin est retirée. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec de l'eau distillée.
4. Les cellules sont colorées avec 1 mL de solution rouge de Sirius pendant 1 heure sous agitation à température ambiante.
5. Les puits sont ensuite lavés successivement avec 1 ml d'eau distillée puis avec 500 µL d'HCl 0.1 M pour éliminer le colorant non lié.
6. Le colorant lié est finalement solubilisé dans 500 µL de NaOH 0,1 M pendant 1 heure sous agitation.
7. L'absorbance est lue à 550 nm en utilisant un lecteur de plaques (200 µL dans une plaque 96 puits)

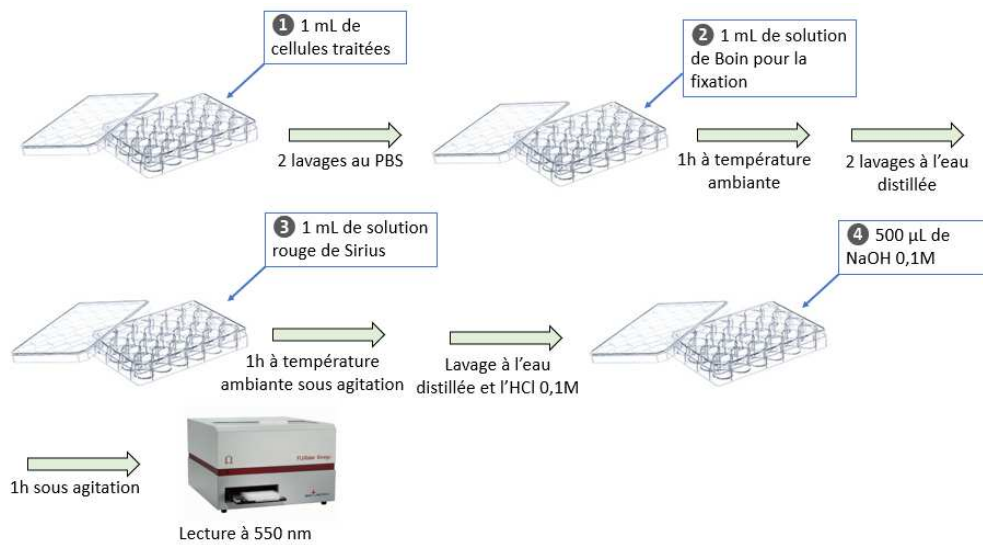


Figure 54 : Protocole illustré du dosage de collagène intracellulaire

b. Dosage de l'acide hyaluronique

Le dosage de l'acide hyaluronique (AH) se fait dans les surnageants cellulaires récoltés lors du dosage de collagène. Pour effectuer ce dosage, un kit ELISA TeCO® Dosage de l'acide Hyaluronique PLUS a été utilisé. Le kit ELISA est un dosage sandwich sensible qui permet de doser le taux d'acide hyaluronique dans les fluides biologiques.

Il utilise une microplaque dont le fond des puits est recouvert par une protéine de liaison de l'acide hyaluronique (HABP) d'une part et de la protéine de liaison HABP conjuguée à HRP pour la détection d'autre part. La protéine de liaison HABP conjuguée à HRP se lie à l'acide hyaluronique contenu dans l'échantillon, puis réagit avec le substrat. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de AH contenu dans l'échantillon.

Mode opératoire : Afin d'éviter les interférences dues à des différences de temps d'incubation, le conjugué HABP-HRP, la solution de substrat et la solution d'arrêt doivent être ajoutés dans les puits de la microplaque dans le même ordre et avec le même intervalle de temps que les échantillons. Il est indispensable d'utiliser une multipipette. Laisser tous les réactifs à température ambiante (20 – 25°C) pendant un minimum de 30 minutes. Pendant l'incubation, couvrir la microplaque avec une feuille adhésive ou un couvercle, puis avec une feuille d'aluminium, ou la placer dans une chambre noire, pour éviter l'exposition à la lumière.

1. Le support et le nombre nécessaire de barrettes de puits sont préparés
2. Les standards (A à F), les contrôles (C1 et C2) et les échantillons sont dilués au 1:50 à l'aide du diluant pour échantillons.
3. 100 µL de chaque standard (A à F), contrôles (C1 et C2) et échantillons dilués sont ajoutés dans les puits correspondants.

4. Les puits sont couverts à l'aide du couvercle, et incubés 2 heures \pm 5 minutes à température ambiante (20 – 25°C), sur un agitateur de plaques (500 tr/min).
5. Après incubation, le contenu des puits est aspiré à l'aide d'un laveur ou séché manuellement, et les puits sont lavés à trois reprises avec 350 μ L de solution de lavage diluée. Il est préférable d'utiliser un laveur automatique. Après le dernier lavage, décanter les puits sur du papier absorbant.
6. 100 μ L de Conjugué HABP-HRP sont ajoutés dans chaque puit immédiatement après le lavage (multipette).
7. Les puits sont couverts à l'aide du couvercle, et incubés 30 \pm 5 minutes à température ambiante (20 – 25°C), sur un agitateur de plaques (500 tr/min).
8. Après incubation, le contenu des puits est aspiré à l'aide d'un laveur, ou séché manuellement, et les puits sont ensuite lavés à cinq reprises avec 350 μ L de solution de lavage diluée. Après le dernier lavage, les puits sont séchés sur du papier absorbant.
9. 100 μ L de Substrat TMB 7 sont ajoutés dans chaque puit immédiatement après le lavage (multipette).
10. La plaque est incubée 30 minutes à température ambiante (20 – 25°C), à l'abri de la lumière, sur un agitateur de plaques (500 tr/min).
11. 100 μ L de Solution d'Arrêt 8 (multipette) sont ajoutés dans chaque puit
12. L'absorption des puits est lu dans les 10 minutes à 450 nm (Filtre de référence à (590 - 620 nm). Si la DO obtenue pour le standard F est supérieure à 3, il est possible de faire une nouvelle lecture à 405 nm.

Courbe des standards : La courbe standard est établie en reportant les concentrations des standards sur l'axe des abscisses et les absorptions correspondantes sur l'axe des ordonnées. Les concentrations d'acide hyaluronique de chaque surnageant dilué sont lues à partir de la courbe standard. Une méthode de calcul à quatre paramètres est utilisé pour calculer automatiquement les résultats. Les échantillons dont les valeurs d'absorption sont supérieures à celles du Standard F sont re-testés après avoir été dilués à l'aide du Standard A et cette dilution est prise en compte pour le calcul de la concentration. Afin de valider le test ELISA, la valeur des contrôles bas et haut sont vérifié et doivent être similaires aux concentrations recommandées par le fournisseur.

Echantillons	Concentration recommandée par le fournisseur	Concentration obtenue
Contrôle bas	Entre 49 et 102 ng/ml	85,94 ng/ml
Contrôle haut	Entre 287 et 478 ng/ml	394,5 ng/ml

c. Test d'inhibition de la métalloprotéinase matricielle (MMP-1)

La MMP-1 catalyse l'hydrolyse du Mca-(7-methosycoumarin-4-yl-acetyl) -Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-(2,4-dinitrophenyl) -L- α , β -diaminopropionyl-Ala-Arg-NH₂ (figure 55).

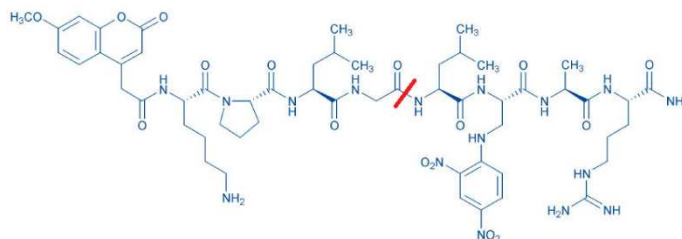


Figure 55 : Clivage du substrat de la MMP-1

Mode opératoire :

Il est nécessaire de maintenir une valeur de pH optimale, à 7,5. Pour la maintenir, une solution tampon contenant de la Tricine à 50 mM, du NaCl à 400 mM et du CaCl₂ à 10 mM a été utilisée. L'inhibiteur de référence utilisé est le piroxicam dont l'IC₅₀ est de 63 μM (Roberto de Andrade Leite S., 2009). Les paramètres ont été définis à la suite d'une phase d'optimisation :

- Gain de fluorescence à **1800**
- Concentration enzymatique finale à **5 nM**
- Concentration finale du substrat à **10 μM**
- Volume final dans chaque puits : **100 μL**

Les tests sont effectués directement dans la microplaque. Celle-ci est incubée séparément de la solution de substrat (0.1 mg/ml), à 25°C pendant 10 minutes, puis 12,5 μL de cette dernière sont ajoutés dans chaque puits. La fluorescence est mesurée à une longueur d'onde d'excitation à 330 nm et d'émission à 390 nm durant une heure, puis le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'Inhibition} = 100 - (V_i \text{ échantillons} / V_i \text{ témoin négatif}) * 100 \pm \text{écart-type}$$

III.4.4 Détermination de l'activité éclaircissante

a. Dosage de la mélanine intracellulaire

Le dosage de la mélanine intracellulaire a été effectué en adaptant le protocole décrit par Pratoomthai et al. (2018).

Mode opératoire : Les cellules B16F0 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à une concentration cellulaire de 5.10⁴ cellules/mL. L'inhibiteur de référence utilisé lors de ce test est l'acide kojique (Sigma Aldrich). Après 24 heures d'adhésion, les cellules sont traitées avec les différentes fractions à deux concentrations (100 et 500 μg/ml) avec et sans α-MSH.

Après 48 heures au contact des différentes fractions, les cellules sont lavées deux fois au PBS (1 ml/puits). Les cellules sont ensuite trypsinées et centrifugées à 1500 xg pendant 10 minutes. Le culot cellulaire obtenu pour chaque puits est lavé deux fois avec du PBS puis dissout dans 200 μ L de NaOH 1M contenant 10 % de DMSO. L'ensemble est ensuite chauffé à 80°C pendant 1 heure. L'absorbance est lue à 405 nm. Les surnageants cellulaires ont été conservés à -80°C afin de doser, par la suite, la sécrétion de mélanine dans les surnageants cellulaires. Afin de pouvoir quantifier la quantité de mélanine présente dans chaque puit, une gamme de mélanine est réalisée (Sigma Aldrich) dans du NaOH 1M contenant 10% de DMSO (*figure 56*).

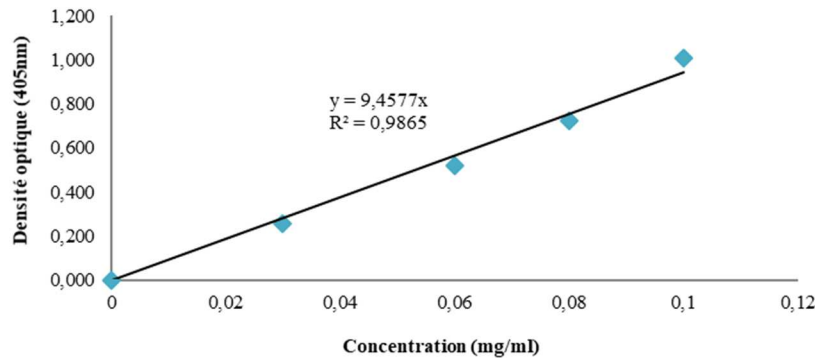


Figure 56 : Gamme de concentration de mélanine intracellulaire dans du NaOH 1M contenant 10% de DMSO

b. Dosage de la mélanine extracellulaire

Le dosage de la mélanine extracellulaire est effectué en adaptant le protocole décrit par Pratoomthai et al. (2018). Les surnageant cellulaire obtenus lors du dosage de la production de mélanine intracellulaire sont décongelés et centrifugés. Le surnageant obtenu est transféré dans une microplaque 96 puits avec un volume final de 200 μ L. L'absorbance est ensuite lue à 475 nm. La quantité de mélanine présente dans les surnageants cellulaires est obtenue grâce à une gamme de mélanine diluée dans du DMEM complet (*figure 57*).

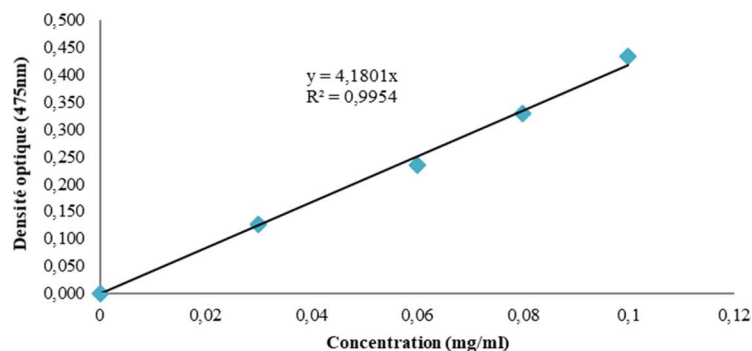


Figure 57 : Gamme de concentration de mélanine extracellulaire dans du DMEM complet

c. Test d'inhibition de la tyrosinase

Le test d'inhibition de la tyrosinase de champignon a été adapté d'après le protocole décrit par Pratoomthai et al. (2018).

Standards, réactifs et échantillons :

- Acide kojique (Sigma Aldrich K3125), Tyrosinase de champignon (Sigma Aldrich T3824)
- K_2HPO_4 / KH_2PO_4 (Sigma Aldrich 1551128/ 1551139)

Mode opératoire :

Pour déterminer les paramètres enzymatiques, une gamme de substrat comprise entre 0,061 et 1 mM est réalisée dans une solution tampon de K_2HPO_4 et de KH_2PO_4 à 0,1 M afin de maintenir le pH à 6,5. La solution mère de tyrosinase est de 20 Unité Internationale (UI)/ml afin d'obtenir une concentration finale de 5 UI/mL. La microplaque et la solution enzymatique sont incubées séparément à 25°C pendant 10 minutes, puis 50 µL de cette dernière sont ajoutés dans chaque puits. La cinétique enzymatique est suivie par mesure de l'absorbance à 475 nm pendant 30 minutes à 25°C. L'absorbance obtenue sera proportionnelle à la quantité de produit formé au cours de la réaction enzymatique. Le logiciel Omega –Data permet de déterminer la pente à l'origine de la courbe correspondant à la vitesse initiale (v_i). Le traitement de données est ensuite réalisé avec le logiciel Sigma Plot 12.5.

La concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de l'inhibiteur de référence de la tyrosinase, l'acide kojique, est déterminée par une gamme de concentrations de 0 à 10 µg/ml dans une solution tampon de K_2HPO_4 et de KH_2PO_4 à 0,1 M. La concentration en substrat utilisée est de 0,25 mM et la concentration enzymatique est identique à la méthode précédente.

La microplaque et la solution enzymatique sont incubées séparément à 25°C pendant 10 minutes, puis 50 µL de cette dernière sont ajoutés dans chaque puits et la cinétique enzymatique est suivie par mesure d'absorbance à 475 nm pendant 30 minutes à 25°C. Les valeurs de v_i sont obtenues avec le logiciel Omega 12–Data. Le traitement de données est réalisé avec le logiciel Sigma Plot 12.5 qui permet de représenter la courbe des valeurs de v_i en fonction des concentrations en acide kojique par une fonction sigmoïde de cinq paramètres. Puis, l'IC₅₀ est déterminé de façon graphique. Concernant les échantillons, la concentration finale en substrat est de 0,25 mM et la concentration enzymatique finale est de 5 UI/mL. Le dosage est réalisé directement dans la microplaque qui est ensuite incubée, séparément de la solution enzymatique de 20 UI/ml, à 25°C pendant 10 minutes. Puis 50 µL de cette dernière sont ajoutés dans chaque puits et l'absorbance est mesurée à 475 nm pendant 30 minutes à 25°C.

Les valeurs de v_i sont obtenues de la même façon et le pourcentage d'inhibition est calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ d'Inhibition} = 100 - (V_i \text{ échantillons} / V_i \text{ témoin négatif}) * 100 \pm \text{écart-type}$$

III.4.5 Détermination de l'activité anti-inflammatoire

Afin de déterminer le potentiel anti-inflammatoire de nos différentes fractions, une lignée très connue de macrophages murins, la lignée RAW 264.7 a été utilisée.

a. Dosage de monoxyde d'azote sécrété par la lignée RAW 264.7

Ce dosage a été réalisé à partir des surnageants cellulaires de la lignée RAW 264.7 et adapté à partir du protocole décrit par Li et Shah (2016). Le réactif de Griess réagit avec le NO pour former un composé stable détectable à 540 nm. L'absorbance mesurée est ainsi directement proportionnelle à la quantité de NO présent dans l'échantillon.

Mode opératoire :

Les cellules sontensemencées en plaques 24 puits, à raison de 1.10^5 cellules/mL dans du milieu DMEM complet (SVF 10% + streptomycine-pénicilline 1%), puis incubées pendant 24 heures avant d'être traitées ou non avec les différentes fractions à différentes concentrations. Après 12 heures d'exposition aux différents composés testés, la moitié des puits contenant les cellules sont stimulées pour produire du NO. Pour cela, les puits sont traités avec du LPS issu de souches de Salmonella (1 $\mu\text{g/mL}$ en concentration finale, Sigma-Aldrich, L2630), tandis que les autres ont reçu du milieu DMEM complet sans LPS (témoin négatif). L'ensemble des plaques a alors été incubé pendant 12 heures supplémentaires à 37°C. Les surnageants ont ensuite été récoltés, centrifugés (10 000 g pendant 10 minutes, 20°C) afin d'éliminer les cellules éventuellement en suspension et les débris.

Le kit *Griess Reagent Kit for Nitrite Determination* (G-7921) Invitrogen™ provenant de Thermo Fischer Scientific est utilisé afin de doser la concentration en NO. 150 μL de chaque surnageant cellulaire sont prélevés pour être dosés à l'aide d'un volume équivalent (150 μL) de réactif de Griess. Enfin, après incubation à température ambiante pendant 30 minutes, l'absorbance est mesurée à 540 nm. En parallèle, une gamme de NO de 0 à 250 μM est effectuée, afin de déterminer la concentration en NO présente dans les différents échantillons. L'ensemble de l'expérience est renouvelé au moins trois fois sur des cultures indépendantes.

b. Analyses transcriptomiques

Les protocoles d'analyses transcriptomiques ont été adaptés à partir des travaux de Péraudeau, E. (2016)

Extraction ARN, dosage et traitement à la DNase I : Les cellules RAW 264.7 sontensemencées à une densité de 8.10^4 cellules/cm² et incubées pendant 24h à 37°C. Le milieu de

culture est ensuite retiré et remplacé par 500 µL de milieu EMEM complet contenant les échantillons à tester.

Les cellules ont subi le même traitement effectué lors du dosage de NO (12h en contact avec les échantillons + 12h en contact avec le LPS). Après les 24h d'incubation à 37°C, le milieu est retiré et les flasques sont rincés trois fois au PBS stérile. Les cellules sont ensuite détachées par dissociation mécanique dans du PBS. Un comptage cellulaire est réalisé, suivi d'une centrifugation pendant 5 minutes à 1200 g. Le surnageant est ensuite éliminé afin de récupérer le culot cellulaire pour l'extraction d'ARN. Cette extraction a été réalisée à l'aide du kit d'extraction d'ARN « RNeasy Plus Mini Kit » (Qiagen 74134). La concentration en ARN extraite pour chaque échantillon est ensuite dosée en déposant 2 µL dans une plaque Lvis (BGM LabTech). Un blanc est aussi réalisé avec 2 µL d'eau « RNase free ». Un traitement à la DNase I est ensuite réalisé afin d'éliminer toute trace éventuelle d'ADN génomique grâce au kit PerfeCTa DNase I (Quantabio 95150-01K).

RT-qPCR : Les ADNs sont synthétisés à partir des ARN extraits pour chaque condition et chaque échantillon. 4 µL de qScript Cdna Supermix 5X (Quantabio 95048-100) sont ajoutés dans un microtube avec l'équivalent de 1 µg d'ARN et de l'eau « RNase free » pour compléter jusqu'à 20 µL. Les microtubes sont ensuite vortexés, centrifugés et placés au thermocycleur avec un programme effectuant 5 minutes à 25°C, 30 minutes à 42°C et 5 minutes à 85°C .

Les ADNc obtenus sont ensuite dilués au 10^{ème} afin de pouvoir effectuer une PCR quantitative. Les couples d'amorces correspondant aux gènes d'intérêts ont été défini à partir du logiciel Primer-BLAST du NCBI, selon des paramètres indiqués par la plateforme LITEC de Poitiers. Les gènes étudiés sont répertoriés dans le *tableau 11*.

Tableau 11: couples d'amorces correspondant aux gènes d'intérêts choisis

Gène	Séquence Forward	Séquence Reverse	Implication	T° (°C)
<i>IL-6</i>	TGAACAACGATGATGCACTTG	CTCTGAAGGACTCTGGCTTTG		60
<i>TNFα</i>	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCACACTCTCCAGCTGCA	Cytokines pro-inflammatoires	64
<i>CXCL2</i>	CAGACTCCAGCCACACTTCA	GGTCTTCAGGCATTGACAGC		60
<i>IFNβ</i>	AGTACAACAGCTACGCCTGG	GAGTCCGCCTCTGATGCTTA		60
<i>IL1β</i>	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCACACTCTCCAGCTGCA		64
<i>iNOS</i>	CAGAGGACCCAGAGACAAGC	CATCCAGAGTGAGCTCCTAGG	Oxydoréductase	60
<i>IL10</i>	GGCTGAGGCGCTGTCATCGATT	GGCCTTGTAGACACCTTGGTCTTGG	Cytokines anti-inflammatoires	60
<i>TGFβ</i>	GCTGCTGACCCCACTGATA	ACAAGAGCAGTGAGCGCTGAA		60
<i>GAPDH</i>	TGCGACTTCAACAGCAACTC	CTTGCTCAGTGCCTTGCTG	Gène de ménage	60

Chaque couple d'amorces a été validé par qPCR, avec le LightCycler 480 en utilisant des plaques UltraFlux 96-Well PCR Plate (SSIBio 3455-40). 2 µL d'ADNc sont déposés dans chaque puits. 8 µL du mélange PCR contenant 5 µL de AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (Vazyme Q111-02), 2 µL d'une solution contenant chaque amorce du couple à 10 µM et 22 µL d'eau ultra pure, sont ajoutés dans chaque puits.

La qPCR est ensuite réalisée en duplicata. Un blanc est réalisé pour chaque couple d'amorces et pour chaque condition testée. Une amplification de l'ADNc du gène de référence, la GaPDH (Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase) est aussi réalisée.

Les étapes de qPCR sont les suivantes : 5 minutes d'activation de l'enzyme ADN polymérase à 95°C, suivies de 45 cycles d'amplification (20 secondes à 95°C, 15 secondes à 60°C et 20 secondes à 72°C). Les résultats sont ensuite analysés grâce au logiciel LightCycler480.

III.5 Modèles murins et tests *in vivo*

Les tests *in vivo* sont effectués au sein de l'équipe de l'UMR NutriNeuro INRA-Université de Bordeaux. Afin d'évaluer le comportement de type anxio-dépressifs mais aussi les altérations cognitives possibles, différents tests comportementaux sont effectués sur des modèles murins ayant reçu un régime riche en graisse (High-Fat-Diet = HFD). Les souris mâles C57BL / 6J, âgées de 5 à 7 semaines (Elevages Janvier Farms), ont été hébergées à raison de quatre à cinq souris par cage sous conditions standard. Les animaux ont été placés dans des cages dans une animalerie maintenue sous des conditions de température (21-23°C) et d'hygrométrie (60%) constantes avec un cycle lumière/obscurité de 12h/12h (8h00-20h00). Après 1 semaine d'acclimatation, les souris ont reçu au hasard un accès libre à un régime standard (STD; STD A04, SAFE) ou un régime HFD (D12451, Research Diet). L'état physique ainsi que la croissance pondérale des animaux ont été suivis tout le long du protocole expérimental. La supplémentation en fractions algales a été réalisée *via* l'eau de boisson (Zemdegs et al. 2019). Au total, 20 souris mâles ont été utilisées par campagne de tests (4 cohortes de 5 souris).

a. Suivi des paramètres métaboliques

Un test permettant d'évaluer la capacité à réguler la glycémie après une surdose de glucose a été effectué. Les animaux ont été individuellement logés, pesés et à jeun pendant 5 h avec libre accès à l'eau. La glycémie a été mesurée à partir d'une piqûre de queue (Accu-Chek Performa Glucometer, Roche) à 0 min (basale), 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min après l'injection intra péritonéale de la solution de glucose à 2 g/kg (Zemdegs et al. 2019).

b. Tests cognitifs

Test de localisation d'objet : La tâche se déroule en trois phases : une phase d'acquisition de 10 minutes, où deux objets identiques sont placés dans l'arène, durant laquelle la souris explore librement l'arène contenant les deux objets. S'en suit une phase de rétention

d'une heure où la souris est replacée dans sa cage hors de la pièce de test. Ensuite, il y a une phase de restitution de 5 minutes, où l'un des deux objets a été déplacé, et durant laquelle la souris explore librement l'arène avec l'objet non déplacé et l'objet déplacé (*figure 58*). Cette phase est filmée.

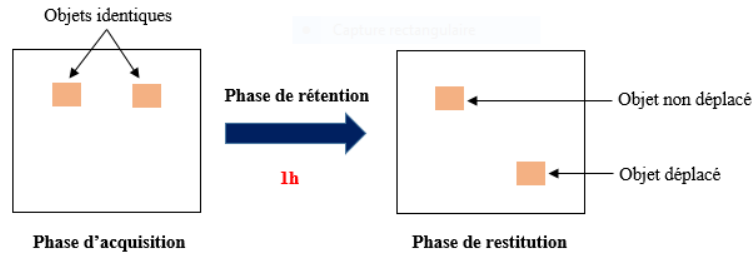


Figure 58 : Principe du test de localisation d'objets contenant trois phases

Le temps passé avec l'objet déplacé et celui avec l'objet non déplacé sont chronométrés par l'expérimentateur lors de l'analyse des vidéos. La performance de reconnaissance spatiale est déterminée par le temps passé avec l'objet déplacé par rapport au temps passé avec l'objet non déplacé lors de la restitution. Le ratio doit être supérieur à 50% pour affirmer que la reconnaissance spatiale de la souris est effective. Moins la souris passe de temps avec l'objet déplacé, moins elle se souvient de cet objet. Le test évalue la mémoire spatiale des souris en se basant sur leur capacité à reconnaître un objet qui a été déplacé dans leur environnement. Ce test se réalise dans une arène blanche.

c. Tests comportementaux de type anxieux :

On retrouve le test du champs ouvert et le test du labyrinthe en croix surélevée pour évaluer le **caractère anxieux** des modèles murins.

Test du champs ouvert : Le test du champs ouvert est constitué d'une arène blanche. Trois zones sont déterminées sur la surface de cette arène : la zone centrale (en vert), la zone intermédiaire (en bleu) et la zone périphérique (en rose). Le test a été effectué dans des boîtes en plexiglas (40 × 40 cm; Mouse Open Field Arena ENV-510, Med Associates) au cours d'une session de 10 minutes. La distance totale ambulatoire a été surveillée à l'aide du logiciel Activity Monitor (SOF-811, Med Associates) (Zemdegs et al. 2019). La souris explore librement l'arène : le temps passé dans chaque zone est mesuré par un système de vidéo tracking. Moins la souris passe de temps dans le centre et plus elle présente un phénotype anxieux. Il repose sur l'effet anxiogène, pour la souris, d'un environnement ouvert exposé à la lumière (*figure 59*).

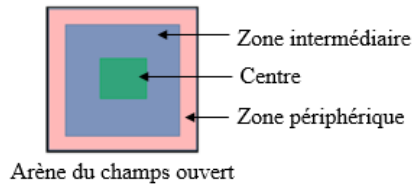


Figure 59 : Principe du test du champs ouvert

Test du labyrinthe en croix surélevée : Le labyrinthe est constitué de 4 bras de 40 cm de longueur et 10 cm de large séparés par un angle de 90°. Deux bras opposés sont sans parois (ouverts) et les deux autres ont des parois de 10cm de haut (fermés). Au centre se situe une plateforme ouverte sur les quatre bras (10cm x 10cm). Le dispositif est fabriqué en pvc gris avec un fond blanc. La hauteur du dispositif est de 80 cm. Les souris sont placées sur la plateforme centrale au début du test et sont libres d'explorer le labyrinthe pendant 5min. Le temps passé dans les différentes zones a été mesuré par le système de vidéo-tracking SMART (Bioseb, France) (Zemdegs et al. 2019). Moins la souris passe de temps dans les bras ouverts et plus elle présente un phénotype anxieux. Ce test permet d'évaluer l'anxiété en se basant sur la peur des souris pour les espaces ouverts, exposés et surélevés (figure 60).

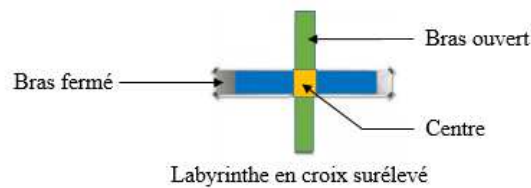


Figure 60 : principe du test du labyrinthe en croix surélevée

Il s'agit d'un labyrinthe en croix surélevé, à 120 cm du sol, formé de 2 bras croisés perpendiculairement (1 bras ouvert et 1 bras fermé). La souris explore librement ce labyrinthe pendant 5 minutes. Le temps passé dans chaque bras et le nombre de « head deeping » considéré comme un comportement à risque sont mesurés. Moins l'animal explore les bras ouverts et moins il fait de « head deeping », plus il présente un phénotype anxieux.

d. Tests comportementaux de type dépressif :

On distingue le test d'incurie, le test de suspension par la queue et le test de nage forcée pour évaluer le **caractère dépressif** des modèles murins.

Test d'incurie : Après avoir vaporisé 200 µl d'une solution de saccharose à 10% sur le museau de la souris, le temps de toilettage est noté comme un indice d'autosoins. Chaque souris est filmée pendant 5 minutes. Le nombre et le temps total de toilettage sont chronométrés par l'expérimentateur lors de l'analyse des vidéos. Moins la souris se nettoie, plus elle présente un

phénotype dépressif. Ce test permet d'évaluer le phénotype pseudo-dépressif des souris en se basant sur la volonté de celles-ci à se toiletter après avoir été vaporisées d'une solution de sucrose sur le dos (Zemdegs et *al.* 2019).

Test de suspension par la queue : Un test de suspension de queue est effectué en utilisant le système de test de suspension de queue (BIOSEB) pendant une session de 6 minutes. Le temps d'immobilité a été noté comme indice de démission. Les mouvements des souris en termes d'énergie et de puissance ont été mesurés pour garantir l'absence de tout biais locomoteur. Les souris sont placées dans des compartiments et sont suspendues par la queue sur un crochet à l'aide d'un scotch. Moins la souris se débat, plus elle présente un phénotype dépressif (Zemdegs et *al.* 2019).

Test de nage forcée : La souris est placée dans une cuve contenant de l'eau. Ces cuves sont filmées par le haut pendant 6 minutes. La latence à l'immobilité ainsi que le temps d'immobilité total cumulé sont chronométrés par l'expérimentateur lors de l'analyse des vidéos. Moins la souris nage, plus elle présente un phénotype dépressif. Ce test évalue le phénotype pseudo-dépressif de la souris en se basant sur sa réponse face à une menace de noyade.

III.6 Tests statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne +/- écart-type. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Origin 6.0. Le test statistique t de Student de type non apparié a été utilisé. Il permet de déterminer s'il y a une différence significative entre le groupe traité et le groupe témoin. Lorsque $p \leq 0.05$, la différence entre le groupe témoin et le groupe test est dite « statistiquement significative ».

Le test t de Student non apparié a été utilisé pour évaluer les effets métaboliques et comportementaux lors des tests sur modèles murins. Pour toutes les expériences, des tests ANOVA unidirectionnelles ou bidirectionnelles ont été appliquées, le cas échéant, par tests post hoc (différence la moins significative protégée) à l'aide de GraphPad Prism (Logiciel GraphPad).

IV. Résultats et Discussions

4.1 Procédé de fractionnement et de purification de biomolécules issues de macroalgues marines

4.1.1 Introduction

Les macroalgues marines peuvent être utilisées pour extraire différents métabolites de haute valeur pour alimenter les industries dans **les domaines dermatoc cosmétique ou nutraceutique**. Ces composés peuvent avoir des avantages physiologiques et nutritionnels importants pour la santé et le bien-être humain. Cependant, la production de certains composés à haute valeur ajoutée issus de macroalgues marines vertes reste difficile. Les techniques d'extractions utilisées afin d'obtenir des rendements satisfaisants nécessitent souvent des besoins en énergie conséquents et l'utilisation fréquente de solvants polluants (Kadam et *al.* 2013; Fleurence et *al.* 1995). Les **technologies d'extraction et de purifications vertes** sont devenues plus souhaitables en raison de leur durabilité et de leurs avantages environnementaux. Cependant, les principales technologies d'extraction éco-compatibles (extraction par fluide supercritique, extraction assistée par micro-ondes, extraction assistée par ultrason, extraction enzymatique et extraction de liquide sous pression) restent **coûteuses à mettre en place** et n'ont pas été mises au point afin d'extraire des composés d'intérêts à partir de macroalgues vertes (Kadam et *al.* 2013).

C'est dans ce contexte que l'entreprise **SEPROSYS** a développé et breveté en 2011, un procédé d'extraction et de purification fractionnée **éco-compatible** n'utilisant ni solvant ni acide (*figure 61*). Il permet d'extraire des biomolécules issues de macroalgues marines, en particulier, issues d'une **biomasse locale**, *Ulva rigida*, provenant de la ferme du Douhet sur l'île d'Oléron. Ce procédé comprend initialement les étapes suivantes :

- a) **Lavage** à l'eau désionisée d'1 kg d'algues à traiter.
- b) **Broyage** des algues lavées en utilisant un blender (10 minutes à 5000 tr/min), libérant de fines particules (5-7 mm).
- c) **Macération** dans l'eau désionisée des algues lavées dans un volume d'eau réduit avec un rapport 1/15 (v/v), à 80°C pendant 2 heures et sous agitation manuelle,
- d) **Filtration** des pulpes à l'aide de cône de filtration, de façon à obtenir un jus de pressage d'une part et des pulpes de pressage d'autre part.
- e) **Etape d'ultrafiltration** du jus de pressage à l'aide d'un pilote d'ultrafiltration équipé d'une membrane de type Kerasep KBW 15 kDa de Novasep Process. La filtration est réalisée à 80°C, 5 bars et à un débit de circulation de 450 L/h, soit une vitesse de circulation de 5 m/s. La filtration est poursuivie jusqu'à obtenir un rétentat d'environ 4°B, qui est alors soutiré de l'unité.
- f) **Déminéralisation** du rétentat d'ultrafiltration : le rétentat est déminéralisé par passage sur une colonne contenant 100 mL de résine anionique forte de type Amberlite FPA 98

sous forme OH⁻, montée en série avec une colonne contenant 200 mL de résine cationique forte de type Amberlite IR 120 sous forme H⁺. La circulation s'effectue à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit de 2 BV/h.

- g) **Floculation** des protéines : le rétentat désionisé est laissé à décanter des cuves en inox à 180°C pendant 1h30.
- h) **Centrifugation** : la fraction protéique et la fraction polysaccharidique sont séparées après une centrifugation à 3000g pendant 15 minutes

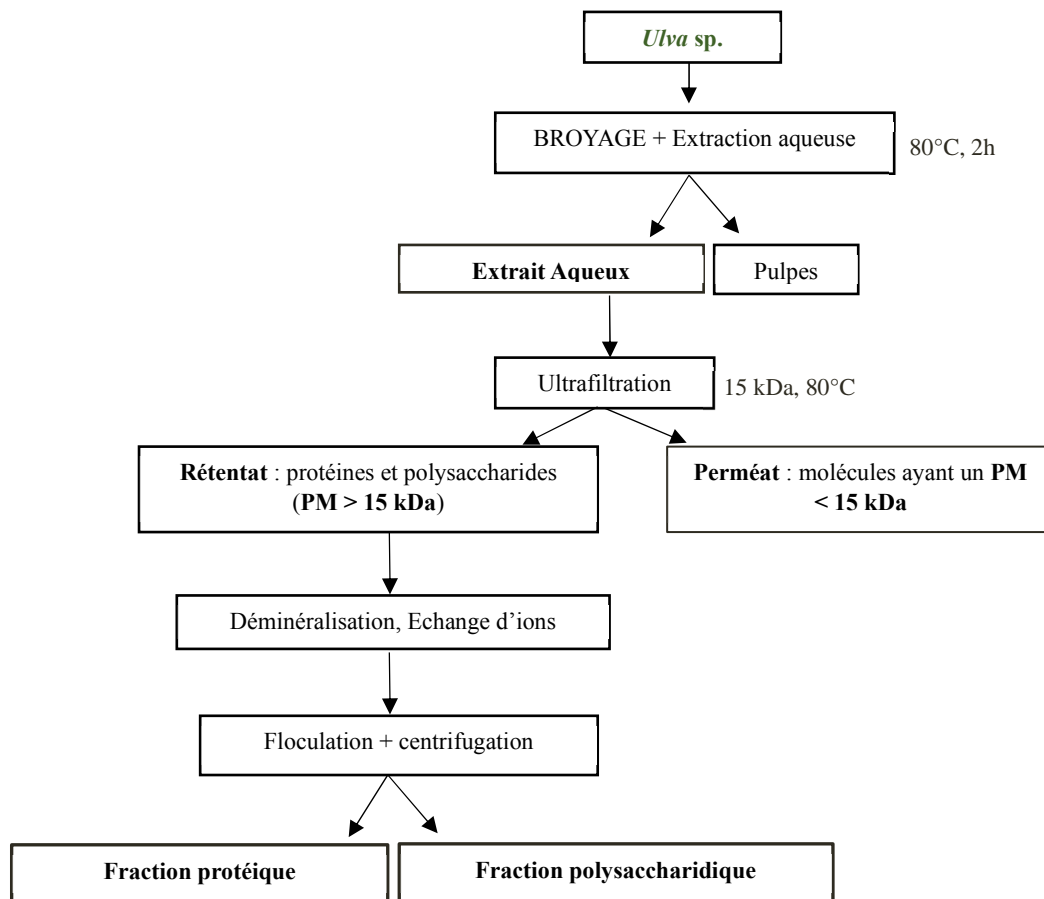


Figure 61: Procédé breveté d'extraction et de purification fractionnée développé par la société Seprosys : procédé n°1 (PM : poids moléculaire).

Ce procédé facilement **transposable à l'échelle industrielle** et **économiquement viable** a fait l'objet d'une première thèse.

Lors de cette précédente thèse, menée par le **Dr Amandine Adrien**, la fraction polysaccharidique provenant d'*Ulva rigida* a pu être caractérisée, dépolymérisée et valorisée dans le domaine de la dermo-cosmétique (activité anti-âge) et dans le domaine de la pharmaceutique (activité anti-coagulante) et de premiers résultats ont pu montrer l'activité pro-collagène de la fraction protéique d'*Ulva intestinalis* (Adrien. 2016). De plus, ces travaux ont permis de montrer qu'il existait différents verrous importants sur le procédé d'extraction SEPROSYS® : l'étape de broyage créant des particules algales de diamètre trop important, la purification des extraits aqueux avant la filtration et les rendements protéiques trop faibles.

La société SEPROSYS et l'équipe BCBS du laboratoire LIENSs ont élaboré un nouveau projet de thèse ayant pour objectifs de résoudre ces différents verrous énoncés précédemment, de passer le procédé d'extraction à plus grande échelle (une dizaine de kg) mais aussi de valoriser les autres fractions du procédé SEPROSYS issus d'*Ulva intestinalis* (**UI**) et d'*Ulva rigida* (**UR**) par l'étude des activités biologiques potentielles, et en particulier, l'activité pro-collagène mis en évidence lors de la thèse précédente des fractions riche en protéines (Adrien. 2016). Ces deux **biomasses locales** sont produites par des algoculteurs sur l'île d'Oléron (la ferme du Douhet) et sur l'île de Ré (Algorithme).

Au sein de cette première partie, les **principaux objectifs** de ces travaux sont :

- **Optimisation des paramètres** du procédé afin d'extraire de façon optimale les protéines et les polysaccharides provenant d'*Ulva intestinalis* et d'*Ulva rigida*,
- **Caractérisation** de la fraction riche en protéine,
- **Production de fractions peptidiques** par dépolymérisation de la fraction protéique.

4.1.2 Amélioration des rendements protéiques et polysaccharidiques du procédé de fractionnement Seprosys

a. Présentation des matières premières : *Ulva intestinalis* et *Ulva rigida* :

La biomasse d'*Ulva intestinalis* a été récoltée par la société Algorithme, basée sur l'île de Ré. La biomasse d'*Ulva rigida* a été récoltée par la ferme aquacole du Douhet, basée sur l'île d'Oléron (tableau 12).

Tableau 12 : Teneur en sels et en protéines (Kjeldahl) de la matière première, *Ulva intestinalis* et *Ulva rigida* (n=3)

	Teneur en sels (m/m _{MS})	Teneur en protéines (m/m _{MS})
<i>Ulva intestinalis</i>	< 5 %	26 % ± 2,78 %
<i>Ulva rigida</i>	47 ± 2 %	15 % ± 4,7 %

La teneur en protéines d'*Ulva intestinalis* correspond aux données de la littérature scientifique. En effet, la teneur en protéines retrouvés chez *Ulva intestinalis* oscille en moyenne entre 6-20 % m/m_{MS} mais peut monter jusqu'à 55% dans de très bonnes conditions de culture et en fonction de la saisonnalité (Benjama et al. 2011; Manivannan et al. 2008; Metin et al. 2018; McDermid et al. 2003). La teneur en sels d'*Ulva intestinalis* est très faible ce qui reste cohérent. En effet, la société Algorithme nettoie la biomasse à l'eau ultrapure après récolte. Concernant la biomasse d'*Ulva rigida*, la teneur en sel est importante puisqu'elle représente quasiment la moitié du poids de l'algue sèche. Ceci est consistant avec le fait que les algues sont directement séchées au soleil après récolte sans lavage à l'eau claire.

Les macroalgues vertes contiennent en moyenne entre 9-26% (m/m_{MS}) de protéines (Kadam et al. 2013). La teneur en protéines varie considérablement d'une étude à une autre. Cela s'explique par le fait que la teneur en protéines varie selon la station de récolte, l'exposition au soleil, la qualité de l'eau et selon les saisons. Une autre étude montre que pour la macroalgue *Ulva rigida*, récoltée sur les côtes françaises, le taux de protéines varie en fonction des saisons (entre 11,3% et 23,6%) (Rouxel et al. 2001). Un autre étude portant sur *Ulva rigida* rapporte une teneur en protéine de 13.8 % MS, ce qui équivaut à nos résultats (Fleurence et al. 1995). La teneur initiale en protéines d'*Ulva rigida* est de 15% soit dans la moyenne de ce qui est retrouvé dans la littérature.

b. Optimisation du procédé et passage à une échelle semi-industrielle :

La première extraction a été effectuée sur la biomasse d'*Ulva rigida*, en raison de **sa grande disponibilité**. Lors de l'extraction réalisée à partir d'*Ulva rigida*, 10 kg d'algues non dessalées ont été préalablement lavées dans 300 L d'eau pendant 10 min à température ambiante. Les algues ont ensuite été essorées et pressées à l'aide d'un cône en tissu afin de retirer le plus d'eau de lavage possible. Elles ont ensuite été broyées avec 150 litres d'eau ultrapure à 80°C pendant 10 minutes puis le mélange a été chauffé à 80°C, sous agitation mécanique pendant 2 h. Au cours de ce procédé, une fraction polysaccharidique (**PSA-UR**) contenant en majorité des polysaccharides (pureté > 85% (Adrien. 2016)) et une fraction protéique (**PROT1-UI/PROT1-UR**) contenant en majorité des protéines ont été obtenus.

Lors de ce premier essai, **différents verrous**, déjà mis en évidence lors de la précédente thèse, ont été détectés comme la nécessité **d'augmenter la pureté** de l'extrait aqueux avant la filtration et les **faibles rendements** protéiques obtenus (*tableau 13*). En effet, ces rendements sont faibles par rapport aux rendements décrits dans la littérature.

Tableau 13 : tableau récapitulatif des rendements obtenus pour les fractions PSA-UR et PROT1-UR.

Rendement (m/m _{MS})	Algue non dessalée :	Algue dessalée :
PSA-UR	3,34 %	6,7 %
PROT1-UR	0,3 %	0,65 %

D'après les travaux de Angell et al. (2017), le rendement protéique obtenu lors d'une extraction aqueuse d'*Ulva ohnoi* est de 6,28% et peut être supérieur (12,28-21,57%) lors d'une extraction alcaline. Il apparaît donc que l'extraction aqueuse, effectuée lors du procédé, ne permettait pas d'extraire la totalité des protéines de l'algue *Ulva rigida*. L'extraction permet d'extraire 3,33 g de protéines sur les 79,5 g disponibles dans la biomasse algale dessalée. Cela peut s'expliquer par l'inaccessibilité de certains composés retenus dans les parois des thalles de macroalgues. En effet, les parois cellulaires des macroalgues sont rigides et servent principalement de support structurel et de protection. Elles se composent d'assemblages de polysaccharidiques et de protéines impliquant des interactions et des liaisons nombreuses et complexes (Kloareg et al. 1988). La dégradation de la paroi cellulaire afin de libérer des

protéines intracellulaires est donc d'une grande importance afin d'optimiser l'utilisation commerciale. De plus, la perte de rendement peut-être due au pressage manuel effectué à l'aide cônes de filtration provoquant une perte de matière. Partant de ce constat, il a été envisagé **d'optimiser le pré-traitement** afin d'améliorer l'extraction en dégradant les parois cellulaires.

Les étapes clés du procédé d'extraction à améliorer sont :

- **L'étape de broyage** dont l'optimisation s'imposait afin de diminuer la granulométrie et d'augmenter la surface d'échange lors de l'extraction. D'après les travaux de Barbarino *et al.* (2005), un broyage physique poussé (utilisation d'un pilon et d'un mortier) augmenterait considérablement le rendement d'extraction de protéines d'*Ulva fasciata* après immersion dans de l'eau ultrapure, passant de 2.7 % à 6 % (m/m_{MS}) (Barbarino *et al.* 2005).
- **L'étape de préfiltration** des particules pour augmenter la surface d'échange, dont le rôle est de libérer les biopolymères et d'éliminer les fines particules d'algues créées lors du broyage, avant l'ultrafiltration. En effet, le broyage libérant de fines particules pouvant être allergènes et diminue fortement la pureté de l'échantillon, il est important de clarifier notre extrait aqueux.

Afin d'améliorer **l'étape de broyage**, l'entreprise SEPROSYS s'est équipée d'un broyeur industriel (*figure 62*). Ce broyeur permet d'obtenir des particules de taille comprise entre 1 et 3 mm. L'amélioration du procédé a été étudiée sur une masse de départ de 10 kg de macroalgues sèches, de la même manière que précédemment.



Figure 62 : Etape de broyage de la biomasse algale *Ulva rigida*

L'algue a tout d'abord été broyée avec 150 litres d'eau ultrapure à 80°C pendant 10 minutes pour obtenir des particules comprises entre 1 et 3 mm. Le mélange a ensuite été chauffé à 80°C, sous agitation mécanique pendant 2 h (*figure 63*).



Figure 63: Etape d'extraction de la biomasse algale *Ulva rigida*. Le changement d'échelle a permis de passer d'une cuve d'extraction ayant une contenance de 2 kg à une contenance de 10 kg de biomasse.

Le mélange effectué dans la cuve de macération a été réalisé en faisant tourner la pompe du système, entraînant un broyage plus poussé des algues. A la fin de l'étape d'extraction, une partie des algues a été finement broyée ($<10 \mu\text{m}$) et un mélange visqueux est obtenu, ce qui pourrait être la conséquence d'une meilleure extraction des polysaccharides. Cette amélioration du broyage nécessite donc d'améliorer les conditions de pré-filtration de l'extrait avant de passer sur le pilote d'ultra-filtration pour éviter une contamination des extraits finaux par de très fines particules d'algues. Dans ce but, la préfiltration a été optimisée par les opérations suivantes (figure 64) :



Figure 64: Récapitulatif des étapes de préfiltration mises en place afin d'optimiser la filtration du procédé Seprosys (cône de filtration, étape de préfiltration à l'aide d'un tamis de $30 \mu\text{m}$ et d'un filtre à plaque)

- **Filtration** de l'extrait aqueux au travers d'un tamis de $30 \mu\text{m}$. De fines particules d'algues restant encore visibles, nous avons continué à affiner la filtration.
- **Pressage des pulpes** obtenues à l'aide d'un presseur pour maximiser la récupération de l'extrait aqueux
- **Centrifugation** à 3000g pendant 10min afin d'éliminer les particules restantes les plus grossières

- **Passage sur un filtre à plaque** équipé de filtres de 1,2 μm puis 0,8 μm pour complètement terminer la clarification de l'extrait aqueux.

A la suite de ces étapes de clarification, un extrait aqueux limpide apte à l'ultrafiltration est obtenu. Le procédé SEPROSYS est ensuite appliqué en modifiant la taille des installations afin de pouvoir extraire à partir d'une quantité plus importante de biomasse algale. L'objectif est de pouvoir adapter ce procédé à tous types de macroalgues vertes. Lors de ce projet, le procédé a donc été adapté pour *Ulva intestinalis*. Le nouveau procédé a été adapté à une quantité plus faible de biomasse (2 kg dessalées) en raison de la limite de disponibilité d'*Ulva intestinalis*. Il est important de prendre en compte pour la suite du projet qu'une nouvelle biomasse *Ulva intestinalis* produite par la Ferme du Douhet pourrait potentiellement répondre à une future demande.

c. Rendements massiques obtenus avec le procédé optimisé

Les rendements massiques obtenus après optimisation des étapes de broyage et de clarification de l'extrait aqueux sont donnés dans la *figure 65*. Au cours de ce procédé, cinq fractions sont obtenues : un extrait aqueux (**EA-UI/EA-UR**) contenant un mélange de biomolécules (protéines, polysaccharides, pigments et minéraux), un rétentat (**R-UI/R-UR**) contenant les biomolécules extraites ayant un poids moléculaire supérieur à 15 kDa, un perméat (**P-UI/P-UR**) contenant les biomolécules extraites ayant un poids moléculaire inférieur à 15 kDa et les minéraux, une fraction polysaccharidique (**PSA-UI/PSA-UR**) contenant en majorité des polysaccharides (pureté > 85% (Adrien, 2016)) et une fraction protéique (**PROT1-UI/PROT1-UR**) contenant en majorité des protéines.

L'optimisation des étapes de broyage et de clarification du procédé SEPROSYS a permis de multiplier par **3,4** les rendements d'extractions protéique et de **2,4** le rendement polysaccharidique d'*Ulva rigida*. Cette augmentation significative du rendement en polysaccharides est cohérente avec les observations visuelles qui montraient une viscosité élevée de l'extrait aqueux en fin de macération. L'optimisation de l'étape de broyage semble avoir permis d'augmenter la surface d'extraction, en cassant plus finement les thalles d'*Ulva rigida*. L'optimisation de la clarification de l'extrait aqueux d'*Ulva rigida* permet d'obtenir un mélange limpide, dépourvue de particules algales libérées lors du broyage.

Ce protocole d'extraction et de fractionnement 2 a également été appliqué afin d'extraire les fractions protéique et polysaccharidique d'*Ulva intestinalis*. Les thalles d'*Ulva intestinalis* étant longs et très fins, l'étape de broyage semblerait essentielle pour favoriser l'extraction, ce qui a justifié le choix du procédé optimisé 2. En raison de la faible quantité d'algue traitée disponible, 500g d'algues ont été utilisés. Néanmoins, la mise en place d'une culture à une échelle supérieure d'*Ulva intestinalis* est en cours sur le site aquacole de la Ferme du Douhet. Les rendements massiques obtenus après l'application du procédé d'extraction et de fractionnement 2 sont donnés dans la *figure 65*.

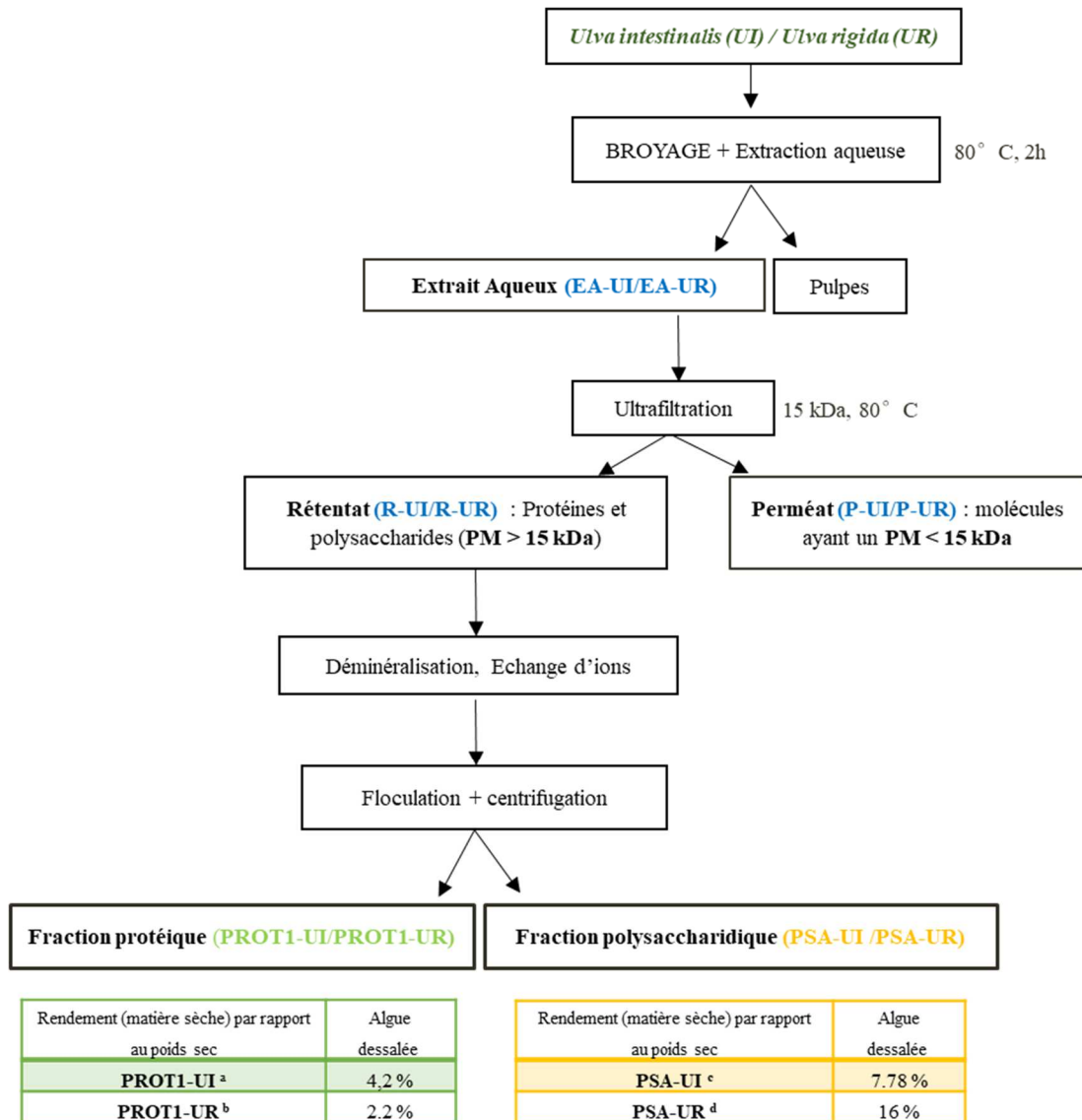


Figure 65 : Récapitulatif des étapes du procédé Seprosys et rendements obtenus pour les fractions PROT1-UI, PROT1-UR, PSA-UI et PSA-UR. ^a Fraction protéique d'*Ulva intestinalis* obtenue après l'application du procédé 2. ^b Fraction protéique d'*Ulva rigida* obtenue après l'application du procédé 2. ^c Fraction polysaccharidique d'*Ulva intestinalis* obtenue après l'application du procédé 2. ^d Fraction polysaccharidique d'*Ulva rigida* obtenue après l'application du procédé 2.

Les rendements concernant les fractions **PSA-UI** et **PSA-UR** sont très satisfaisants. En effet, d'après les travaux de Peasura et al. (2015), l'extraction aqueuse d'*Ulva intestinalis* permet d'obtenir des rendements en polysaccharides sulfatés entre 6 et 12% en fonction du temps d'extraction (1h à 24h) à 80°C. Le rendement de la fraction polysaccharidique (**PSA-UI**) obtenu lors de notre étude est similaire à celui correspondant à 2h d'extraction à 80°C retrouvé dans l'étude de Peasura et al. (2015). Néanmoins, la fraction polysaccharidique **PSA-UI** montre un rendement plus faible que pour *Ulva rigida* (**PSA-UR**). Les thalles d'*Ulva intestinalis* sont différents de ceux observés chez l'espèce *Ulva rigida*. Ils sont plus élancés et plus fins, rendant le broyage plus difficile à maîtriser. La paroi cellulaire des thalles d'*Ulva intestinalis* est extrêmement rigide, en raison de leur teneur très élevée en polysaccharides structuraux, proche de 63 % (Dodson et al. 2009). Cela s'explique par le fait que ces thalles

doivent pouvoir subir les pressions et contraintes environnementales.

Concernant les rendements des fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR**, ils restent en-deçà de ce qui est retrouvé dans la littérature. En 1995, Fleurence et *al.* ont comparé différentes méthodes d'extraction à partir d'*Ulva rigida*. Ils sont parvenus alors à extraire 9.73 % des protéines de l'algue par macération, puis à augmenter le rendement jusqu'à 27 % en associant à cette première étape d'extraction aqueuse une seconde extraction en condition dénaturantes, impliquant un solvant composé de NaOH (0.1 M) et de β -mercaptoéthanol (Fleurence et *al.* 1995). Ce rendement est supérieur à celui obtenu lors du procédé SEPROSYS mais les conditions dénaturantes utilisées ne sont pas éco-compatible et celles-ci sont susceptibles de dégrader les protéines natives. Si on compare nos résultats à ceux de Barbarino et *al.* (2005), le rendement d'extraction protéique de la fraction **PROT1-UR** est similaire à celui obtenu lors de l'extraction aqueuse d'*Ulva fasciata* (2.7 % m/m_{MS}). A l'instar des résultats obtenus à partir d'*Ulva rigida*, les rendements obtenus pour *Ulva intestinalis* restent faibles. Néanmoins, le rendement de la fraction protéique est plus élevé que pour *Ulva rigida*, ce qui peut s'expliquer par une teneur initiale en protéines plus élevée dans la biomasse d'*Ulva intestinalis*.

Il est important de se rappeler qu'environ 10 % des protéines totales de l'algue sont retenues entre ces polysaccharides, rendant leur extraction plus difficile. Il est donc nécessaire de dégrader ces liaisons avec les polysaccharides afin de libérer ces protéines emprisonnées dans les parois cellulaires pour augmenter la surface d'échange lors de l'extraction et augmenter ces rendements (Dodson et *al.* 2009).

d. Composition biochimique des différentes fractions provenant des extractions d'*Ulva rigida* et d'*Ulva intestinalis*

Une fois lyophilisées, les différentes fractions obtenues ont été caractérisées afin de mettre en évidence leurs différentes compositions. Afin de pouvoir comparer le procédé Seprosys initial (1) et le procédé Seprosys optimisé (2), nous avons tout d'abord caractérisé les fractions provenant de l'application de ces 2 procédés à l'algue *Ulva rigida* (tableau 14 et 15).

Tableau 14: Compositions biochimiques des différentes fractions obtenues lors de l'application du procédé 1 à *Ulva rigida*. ^a Extrait aqueux d'*Ulva rigida*. ^b Rétentat d'*Ulva rigida*. ^c Perméat d'*Ulva rigida*. ^d Fraction protéique d'*Ulva rigida*. ^e Fraction polysaccharidique d'*Ulva rigida*. * groupement sulfate présent sur les polysaccharides.

Procédé 1 <i>Ulva rigida</i>	Teneurs massiques (matière sèche)					
	Protéines	Sucres totaux	Acides uroniques	Polyphénols	Lipides	Equivalent sulfates*
EA-UR ^a	25,2 ± 4%	53 ± 2,1%	20 ± 5%	2 %	< 1 %	21 ± 4%
R-UR ^b	26,9 ± 1%	77,2 ± 4 %	16 ± 2%	< 1 %	< 1 %	38 ± 3%
P-UR ^c	7,2 ± 2,5%	29,5 ± 3 %	3 ± 2%	< 1 %	< 1 %	12 ± 1%
PROT1-UR ^d	52 ± 3,5%	23 ± 1,5 %	9 ± 3%	< 1 %	< 1 %	15 ± 3%
PSA-UR ^e	5.4 ± 4%	75 ± 2%	8 ± 1%	< 1 %	< 1 %	16 ± 3%

Tableau 15: Compositions biochimiques des différentes fractions obtenues lors de l'application du procédé 2 à *Ulva rigida*.^a Extrait aqueux d'*Ulva rigida*. ^b Rétentat d'*Ulva rigida*. ^c Perméat d'*Ulva rigida*. ^d Fraction protéique d'*Ulva rigida*. ^e Fraction polysaccharidique d'*Ulva rigida*. * groupement sulfate présent sur les polysaccharides.

Procédé 2 <i>Ulva rigida</i>	Teneurs massiques (matière sèche)					
	Protéines	Sucres totaux	Acides uroniques	Polyphénols	Lipides	Equivalent sulfates*
EA-UR ^a	20 ± 3.2%	65 ± 4%	22 ± 2%	2 %	< 1 %	28 ± 1%
R-UR ^b	9 ± 4%	83 ± 2 %	11 ± 6%	< 1 %	< 1 %	42 ± 1%
P-UR ^c	35.8 ± 6%	19 ± 2 %	6 ± 3%	< 1 %	< 1 %	22 ± 3%
PROT1-UR ^d	53 ± 4%	15 ± 3 %	5 ± 9%	< 1 %	< 1 %	22 ± 1%
PSA-UR ^e	8 ± 4%	80 ± 5%	6 ± 2%	< 1 %	< 1 %	13 ± 2%

Les teneurs en sucres totaux et en acides uroniques permettent d'estimer la teneur en polysaccharides globales présente dans les différentes fractions. **EA-UR** et **R-UR** contiennent en majorité des polysaccharides, avec respectivement 53% et 77% pour l'extraction 1 et, 65 % et 83 % pour l'extraction 2 optimisée.

L'extrait aqueux provenant de l'extraction 1 d'*Ulva rigida* (**EA-UR**) contient moins de polysaccharides que celui issu de l'extraction 2 optimisée. En revanche, des teneurs équivalentes en protéines sont obtenues. Le broyage a donc permis d'extraire plus de polysaccharides retenus dans les parois cellulaires. Concernant les rétentats d'ultrafiltration (**R-UR**), ils sont riches en polysaccharides quelque soit la version appliquée du procédé. En revanche, une perte de 20 % de protéines est observée dans la fraction **R-UR** provenant du procédé 2. Les deux fractions **P-UR** montrent des proportions en polysaccharides et en protéines différentes. Le procédé 1 permet d'y retrouver plus de polysaccharides et peu de protéines alors que le procédé 2 optimisé donne un résultat inverse : plus de protéines et moins de polysaccharides. Cette différence peut s'expliquer par le fait que l'optimisation du broyage a sans doute contribué à la dépolymérisation de certaines protéines par action mécanique, diminuant leur poids moléculaire en dessous de 15 kDa et leur permettant alors de traverser la membrane de filtration. Ces résultats sont cohérents avec la forte augmentation de la teneur en protéines de la fraction **P-UR** observée après application du procédé 2. Il est à noter que le taux de recouvrement de la composition de **P-UR** est très éloigné de 100%, ce qui est vraisemblablement due au fait que les sels et les petites molécules (acides aminés, peptides ou monosaccharide) ne sont pas détectés par les méthodes de dosage que nous avons appliquées.

Concernant les fractions **PROT-UR**, on retrouve des proportions similaires en protéines et en polysaccharides. Ces fractions contiennent environ 52% de protéines et 20 à 32 % de polysaccharides. Les fractions **PSA-UR** présentent elles aussi des profils similaires. Ces fractions sont riches en polysaccharides, de l'ordre de 85%, et contiennent une faible proportion de protéines (< 10 %).

Les résultats obtenus lors de l'application du procédé 2 à l'algue *Ulva intestinalis* sont reportés dans le *tableau 16* :

Tableau 16: Compositions biochimiques des différentes fractions obtenues lors de l'application du procédé 2 à *Ulva intestinalis*.^a Extrait aqueuse d'*Ulva intestinalis*. ^b Rétenant d'*Ulva intestinalis*. ^c Perméat d'*Ulva intestinalis*. ^d Fraction protéique d'*Ulva intestinalis*. ^e Fraction polysaccharidique d'*Ulva intestinalis*. * groupement sulfate présent sur les polysaccharides.

Procédé 2 <i>Ulva intestinalis</i>	Teneurs massiques (matière sèche)					
	Protéines	Sucres totaux	Acides uroniques	Polyphénols	Lipides	Equivalent sulfates *
EA-UI ^a	12,3 ± 4 %	33,7 ± 3,4 %	10 ± 2%	< 1 %	< 1 %	28 ± 2%
R-UI ^b	23 ± 2%	49,3 ± 4,2 %	14 ± 3%	< 1 %	< 1 %	31 ± 1%
P-UI ^c	10 ± 1,2%	23,6 ± 2%	2 ± 1%	< 1 %	< 1 %	6 ± 1%
PROT1-UI ^d	51 ± 4,6%	22 ± 3,8 %	6 ± 3%	< 1 %	< 1 %	16 ± 1%
PSA-UI ^e	11± 2%	74± 4%	10 ± 4%	< 1 %	< 1 %	22 ± 3%

L'**EA-UI** et **R-UI** contiennent 33,7% et 50% de polysaccharides, soit deux fois moins que l'**EA-UR**. La fraction **P-UI** contient seulement 10% de protéines contre 36 % pour la fraction **P-UR**. Concernant les fractions **PROT1-UI** et **PSA-UI**, on retrouve une teneur en protéines et en polysaccharides totaux similaires aux fractions **PROT1-UR** et **PSA-UR**.

L'optimisation du procédé SEPROYS® permet d'augmenter les rendements massiques et de produire, en outre, une fraction riche en protéine (**PROT1**). Afin de confirmer que l'optimisation du broyage a permis la dégradation de la paroi cellulaire libérant des protéines intracellulaires, la nature des protéines présentes dans les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** a été déterminée.

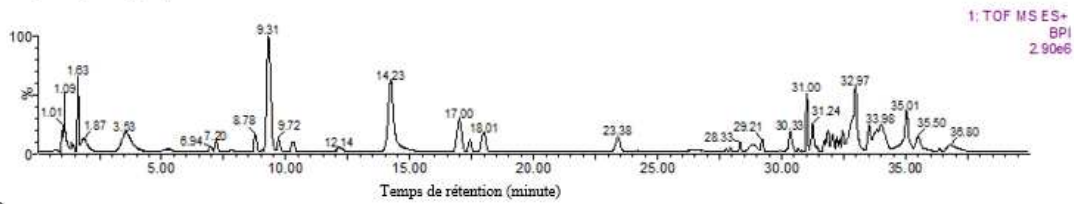
e. Digestion trypsique des fractions protéiques **PROT1-UI** et **PROT1-UR**

Afin de déterminer la nature des protéines présentes dans les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR**, ces fractions ont subi une digestion trypsique. Les protéines présente dans les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** sont hydrolysées en fragments peptidiques. Ces peptides ainsi formés vont être analysés en spectrométrie de masse afin d'obtenir leur masse et des informations sur leur composition en acides aminés. Les résultats de ces analyses de spectrométrie de masse vont pouvoir confrontés à des informations contenues dans des banques de protéines, afin d'identifier la ou les protéine(s) analysée(s) à l'aide du logiciel UNIPROTKB.

La figure 64 présente les deux spectres UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS obtenus pour les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR**. Ces fractions montrent des signatures spectrales différentes, avec des pics communs pouvant représenter des séquences peptidiques communes. On peut donc s'attendre à retrouver des familles de protéines communes entre les deux macroalgues du genre *Ulva*.

A.

Hydrolyse trypsique de la fraction PROT1-UI



B.

Hydrolyse trypsique de la fraction PROT1-UR

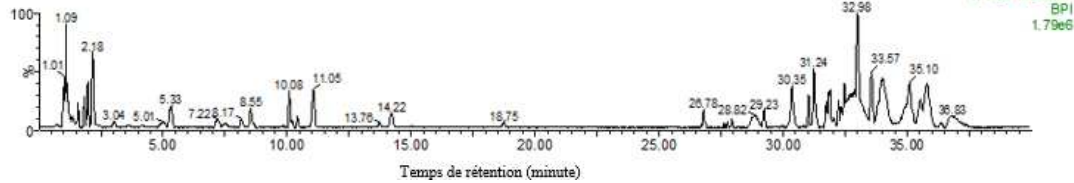


Figure 64 : Chromatogrammes UHPLC obtenus après digestion trypsique des fractions PROT1-UI (A) et PROT1-UR (B)

Les spectres vont contenir des pics d'intensité variable représentant le ratio entre la masse (m) et la charge z des molécules (m/z). La fragmentation en MS/MS va couper le peptide à différents endroits, et ainsi créer une série d'ions C'est l'analyse de ce spectre de second degré qui permet de remonter à la structure de l'ion parent. Le nombre de pics présents dans un spectre MS/MS est variable et dépend de la longueur du peptide, comme montré dans l'exemple ci-dessous avec le spectre d'analyse Q-TOF MS/MS du peptide SSGTSPDVLK, issu de l'auto-hydrolyse de la trypsine au sein de la fraction **PROT1-UI**, avec une masse moléculaire sous forme protonée obtenue $[M+H]^+$ $m/z=577,2922$. (figure 65).

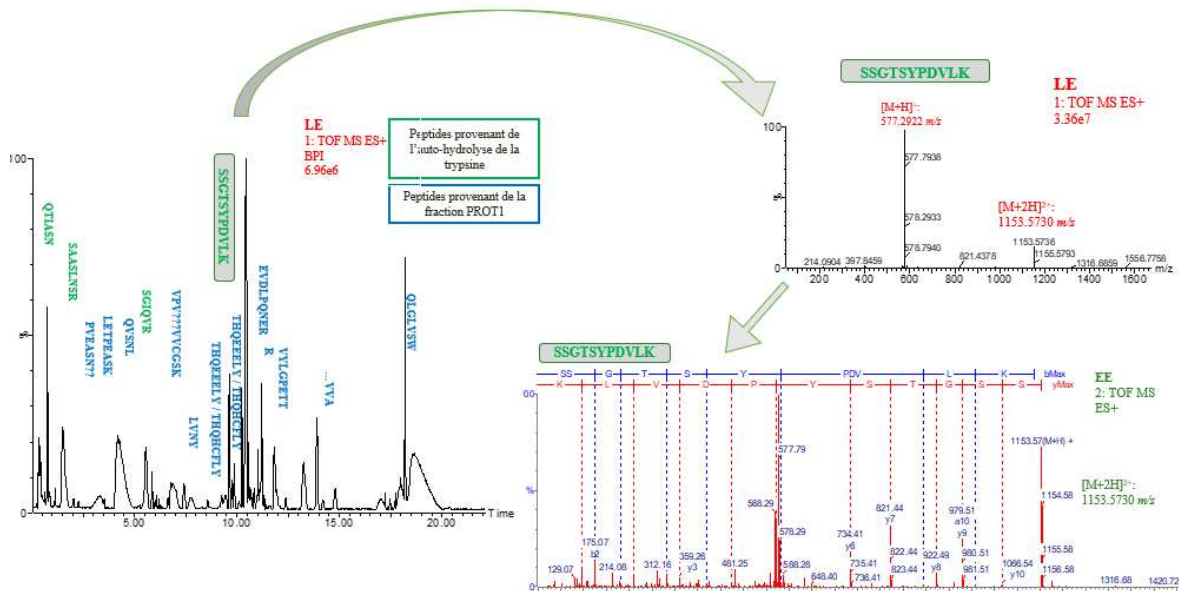


Figure 65 : Ensemble des étapes permettant de déterminer la séquence peptidique à partir du spectre de fragmentation du peptide SSGTSPDVLK. (1) Chromatogramme MS obtenu après séparation en UPLC sur C18 (2) Spectre d'analyse Q-TOF MS/MS du peptide VY. Masse moléculaire sous forme protonée obtenue $[M+H]^+$ $m/z=577,2922$.

Les peptides obtenus lors de la digestion trypsique ont permis d'identifier des protéines communes susceptibles d'être représentées dans les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR**. On retrouve les protéines suivantes :

- Ribulose biphosphate carboxylase large chain (RUBISCO)
- Facteur d'élongation Tu, chloroplastique
- 5'-adenylylsulfate réductase
- Actine (cytoplasme)
- ATP synthase (sous-unité β), chloroplastique
- Photosystème p700 chlorophylle a-apoprotéine A2 / 5'-adenylylsulfate réductase
- Facteur d'élongation EFL/ Elongation factor-1 alpha-like protein
- Cytochrome C
- ATP Synthétase

La digestion trypsique a permis de mettre en évidence des familles de protéines se trouvant communément dans les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR**. Polikovsky et *al.* ont extraits et identifiés différentes protéines issues de macroalgues du genre *Ulva*. Ils ont démontré la présence de RuBisCO, d'actine, d'ATP synthase, du photosynthèse p700 et du facteur d'élongation EFL, confirmant nos résultats (Polikovsky et *al.* 2019). La grande majorité de ces protéines sont des protéines intracellulaires composant le système de transport d'électrons de la chaîne respiratoire (Bischof et *al.* 2002; Reiskind, et *al.* 1989). Ces résultats sont intéressants et viennent confirmer que l'optimisation de l'étape de broyage a permis la dégradation de la paroi cellulaire libérant des protéines intracellulaires. Le broyage est donc susceptible, **sans ajout d'enzyme ou de solvant**, par action conjointe de contraintes mécaniques et thermiques d'avoir permis la dégradation des parois et membranes cellulaires et donc permis **la libération de polymères intra-cellulaires**, augmentant le rendement.

4.1.3 Caractérisation de la fraction protéique

L'un des objectifs de ces travaux de thèse était de **valoriser la fraction protéique** issue du procédé Seprosys. La caractérisation de la fraction structurale des fraction protéiques d'*Ulva intestinalis* et d'*Ulva rigida* a donc été réalisée en premier lieu.

a. Caractérisation des fractions protéiques par chromatographie liquide haute performance

Afin de déterminer les poids moléculaires des protéines présentes dans les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR**, nous avons utilisé une méthode de séparation par chromatographie en phase liquide à haute performance de type exclusion de taille (HPL-SEC) sur une colonne TSKGel 3000SW permettant une séparation par la taille des constituants du mélange. Afin d'évaluer la diversité des poids moléculaires, nous avons utilisé une gamme étalon allant de

669 kDa et 1 kDa en nous basant sur la méthode décrite par Richter *et al.* (1983).

Concernant la fraction **PROT1-UI**, les deux populations protéiques majoritaires se distinguent (*figure 66*) :

- Une population protéique ayant un poids moléculaire supérieur à 669 kDa.
- Une population protéique ayant un poids moléculaire majoritaire de 22 kDa avec des poids moléculaires allant de 60 à 3 kDa.

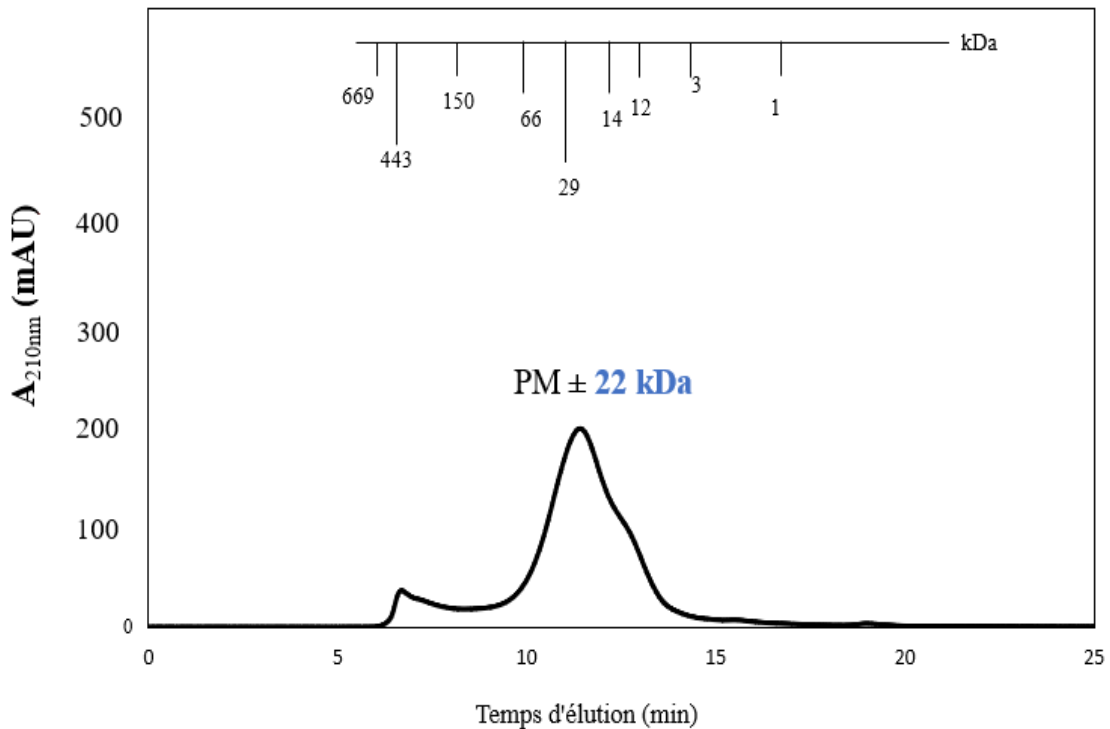


Figure 66 : Profil chromatographique de la fraction PROT1-UI (*Ulva intestinalis*) à 210 nm en fonction du temps d'éluion (min)

Fleurence *et al.* (1995) ont mis en évidence, sur un gel d'électrophorèse, une majorité de bandes ayant des poids moléculaires aux alentours de 22-23 kDa chez *Ulva rigida* et *Ulva rotundata*. Ces résultats sont cohérents avec nos résultats, et il se peut que la population protéique mis en évidence par Fleurence *et al.* soit aussi présente chez *Ulva intestinalis*. Une autre étude montre l'existence de deux populations protéiques majoritaires chez *Ulva* sp., l'une ayant un poids moléculaire moyen de 20 kDa et l'autre population ayant un poids moléculaire moyen de 40 kDa (Wijesekara *et al.* 2017).

La fraction **PROT1-UR** présente trois populations protéiques majoritaires (*figure 67*).

- Une population protéique ayant un poids moléculaire supérieur à 669 kDa.
- Une population protéique ayant un poids moléculaire majoritaire de 15 kDa avec des poids moléculaires allant de 30 à 3 kDa.
- Une population peptidique ayant un poids moléculaire inférieur à 2 kDa (environ 18 acides aminés).

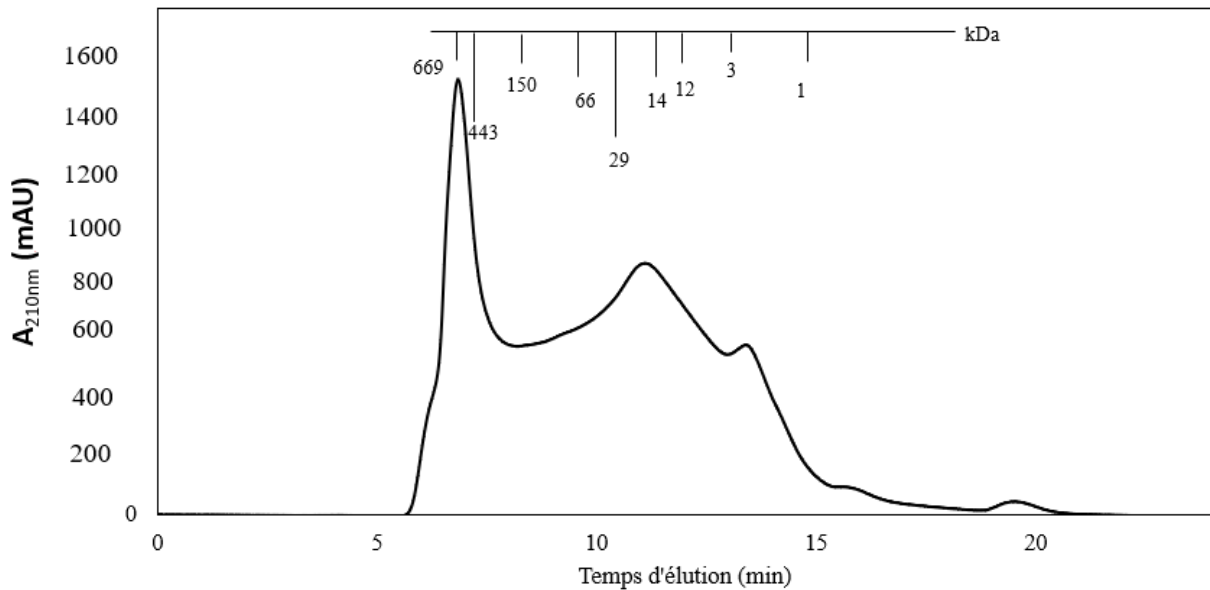


Figure 67 : Profil chromatographique de la fraction PROT1-UR (*Ulva rigida*) à 210 nm en fonction du temps d'éluion (min)

Si on compare nos résultats avec les travaux de Fleurence *et al.* (1995), on retrouve une population protéique commune aux alentours de 12 kDa et de 27 kDa chez *Ulva rigida*. En revanche, une autre étude décrit une population protéique, obtenu par SDS-Page ayant un poids moléculaire situé entre 45 et 70 kDa (Rouxel *et al.* 2001). Cette population reste peu visible sur le chromatogramme, même si une faible population protéique est éluée entre 10 et 11 minutes, correspondant à un poids moléculaire entre 66 et 40 kDa.

Les différences observées peuvent s'expliquer de différentes façons. Tout d'abord, les macroalgues sont composées de protéines pouvant être différentes et présentent en différentes teneurs en fonction des saisons, de la qualité de l'eau et du stress hydrique (Harnedy *et al.* 2011). De plus, les méthodes d'extractions utilisées afin de caractériser ces protéines peuvent être différentes (alcaline, acide, aqueuse) et libérer différentes quantités de protéines (Wijesekara *et al.* 2017). Les analyses chromatographiques (HPL-SEC) ne permettant pas une résolution optimale, il est nécessaire de les associer à une analyse par électrophorèse SDS-Page afin de confirmer les résultats obtenus.

b. Caractérisation des fractions protéiques par technique électrophorétique

Afin de confirmer les résultats précédents, nous avons analysé les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** par électrophorèse SDS-PAGE, en utilisant des gel d'acrylamide à 14%. L'analyse électrophorétique SDS-PAGE permet de séparer les protéines présentes en fonction de leur poids moléculaire.

Le résultat obtenu pour la fraction **PROT1-UI** est donné sur la *figure 68*. Des différences notables sont visibles entre les résultats obtenus pour *Ulva intestinalis* et pour *Ulva rigida*.

Différentes populations protéiques sont visibles telles qu'une bande à 20 kDa, une autre bande aux alentours de 17 kDa et une multitude de bandes très peu résolues en bas du gel d'électrophorèse. Les poids moléculaires obtenus sont plutôt cohérents avec ceux obtenus grâce aux profils HPL-SEC. Il manque néanmoins une population protéique de haut poids moléculaire visible sur le profil HPLC. Il est possible que ces protéines de hauts poids moléculaires soient restées bloquées en haut du gel d'électrophorèse à cause du maillage serré d'acrylamide qui peut retenir des populations protéiques en fonction du pourcentage d'acrylamide. En effet, un pourcentage élevé permet la migration de petites protéines alors qu'un pourcentage faible permet la migration de grosses protéines le long du gel.

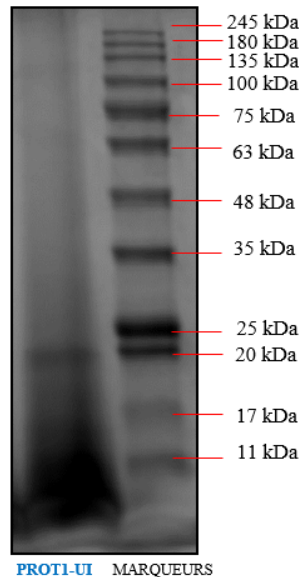


Figure 68 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE présentant le profil protéique de la fraction PROT1-UI. Gel d'acrylamide à 17 %

Les analyses électrophorétiques ont permis de confirmer la présence des populations protéiques identifiées grâce aux analyses HPL-SEC. La fraction protéique d'*Ulva rigida* (**PROT1-UR**) est composée d'une population protéique de hauts poids moléculaires, une population protéique aux alentours de 60 kDa et une population de bas poids moléculaires. La fraction protéique d'*Ulva intestinalis* (**PROT1-UI**) possède une population de hauts poids moléculaires et une population majoritaire ayant un poids moléculaire de 20 kDa. Le résultat obtenu pour la fraction **PROT1-UR** est donné sur la figure 69.

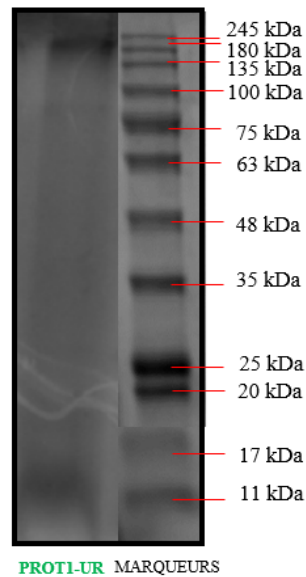


Figure 69 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE présentant le profil protéique de la fraction PROT1-UR. Gel d'acrylamide à 17 %

On remarque en premier lieu une bande importante en haut du gel, montrant qu'une partie des protéines n'a pas migré sur le gel d'électrophorèse. Cette bande épaisse représente les **protéines de hauts poids moléculaires**. Elle est très peu résolue à cause du choix du maillage et pourrait représenter la population protéique de haut poids moléculaire visible sur les profils HPLC. On remarque aussi de très fines bandes à **75 kDa** et une autre bande située entre **48 et 63 kDa**. Ces populations protéiques ne ressortent pas sur le profil HPLC, même si on remarque un signal latent entre 10 minutes et 10 minutes 30 secondes correspondant à 66-80 kDa. Néanmoins, cette population protéique a été détectée chez *Ulva rigida* par Rouxel et al. (2001). De plus, on remarque la présence de bandes peu résolues et de faible intensité en bas du gel d'électrophorèse représentant des populations protéiques de bas poids moléculaire. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus sur le profil HPLC, où l'on a identifié une importante population protéique de bas poids moléculaire. Après avoir confirmé les profils protéiques des fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** par analyses électrophorétiques, leur composition en acides aminés libres a été déterminée par des analyses UPLC-MASS.

c. Composition en acides aminés totaux des fractions protéiques PROT1-UI d'*Ulva intestinalis* et PROT1-UR d'*Ulva rigida*

La quantité d'acides aminés totaux retrouvée dans les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** est donnée dans la *figure 70*. La fraction **PROT1-UI** est composée majoritairement de leucine (27,2%), d'isoleucine (23,3%) et de valine (28,4%). La fraction **PROT1-UR**, tout comme **PROT1-UI**, est majoritairement composée de leucine (21,1%), d'isoleucine (16,8%), de valine (20,9%), de phénylalanine (14,5%) et de proline (12,3%). La proline et la phénylalanine sont retrouvées en plus faibles quantités dans la fraction **PROT1-UI**, avec respectivement 5,2 % et 6,9 %.

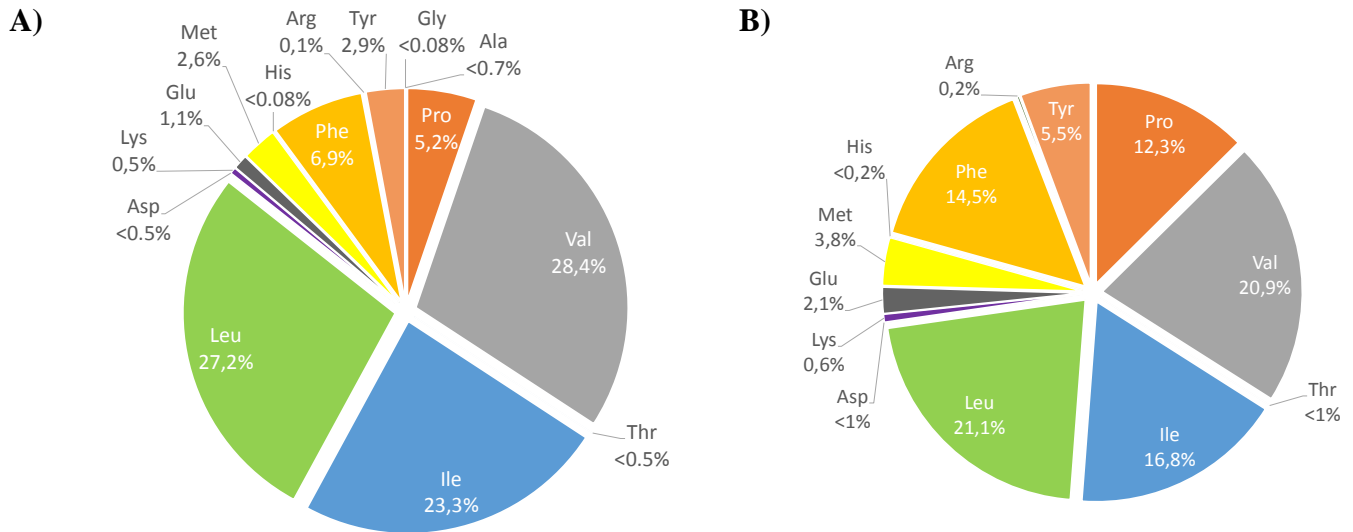


Figure 70 : Compositions en acides aminés totaux de la fraction PROT1-UI, issue d'*Ulva intestinalis* (A), et de la fraction PROT1-UR, issue d'*Ulva rigida* (B).

D'après Lewis et al. (1960), les acides aminés majoritaires chez *Ulva intestinalis* sont la proline, la méthionine et l'acide aspartique. Les résultats obtenus pour la fraction **PROT1-UI** lors de nos travaux diffèrent de la littérature. De même pour la fraction **PROT1-UR**, les acides aminés retrouvés majoritairement sont l'alanine, l'acide aspartique et l'acide glutamique (Shuuluka et al. 2013). La composition en acides aminés peut varier en fonction de la saison, la période et le lieu de récolte mais aussi en fonction du stade de croissance de l'algue (Lewis et al. 1962). Ces faits peuvent expliquer les différences observées ici.

L'un des objectifs de ces travaux est la production de fractions protéique et polysaccharidique de bas poids moléculaire. Les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** présentées précédemment ont été utilisées afin d'obtenir des fractions peptidiques.

4.1.4 Obtention et caractérisation de fractions protéiques et polysaccharidiques de bas poids moléculaire

Dans une protéine, la plupart des séquences peptidiques sont inactives mais possèdent des fonctions biologiques après hydrolyse enzymatique. Les algues marines possédant une teneur en protéines élevée, leur utilisation comme source de peptides bioactifs suscite un intérêt croissant (Hamed et al. 2015). En effet, elles présentent une forte potentialité en matière de promotion de la santé et de traitement des maladies. Les peptides bioactifs sont généralement composés de 2 à 20 acides aminés (Hamed et al. 2015), leurs faibles poids moléculaires les rendent plus facilement digestibles et biodisponibles que les protéines. Les hydrolysats protéiques ont déjà de nombreuses activités biologiques reconnues incluant des activités

immunomodulatrice, anticancéreuse, anti hypertensive, antioxydante, anti-inflammatoire ou encore antibactérienne (Bhat et al. 2015; Biziulevicius et al. 2006; García et al. 2013; Chalamaiah et al. 2012).

L'un des objectifs du projet Neuronalg étant la production de fractions peptidiques susceptibles de traverser la barrière intestinale et/ou la barrière encéphalo-rachidienne, le poids moléculaire des fractions protéiques **PROT1-UI** et **PROT1-UR** a été diminué afin d'obtenir des peptides assimilables par l'organisme. L'hydrolyse in vitro des protéines d'algues à l'aide d'enzymes protéolytiques est le procédé le plus couramment utilisé pour dépolymériser les protéines. Dans la même logique, nous avons également dépolymérisé les fractions polysaccharidiques d'*Ulva intestinalis* (**PSA-UI**) et d'*Ulva rigida* (**PSA-UR**) afin d'obtenir des oligosaccharides bioactifs susceptibles de traverser les barrières intestinale et hémato-encéphalique. Afin de réaliser cette hydrolyse, nous avons adapté une méthode de dépolymérisation par catalyse acide supportée déjà mise au point au sein du laboratoire (Adrien et al. 2017). L'utilisation d'enzymes hydrolytiques a cette fois été proscrite en raison de la faible disponibilité de ce type de biocatalyseur et du coût très élevé de leur application.

a. Hydrolyse enzymatique des fractions protéiques d'*Ulva intestinalis* et d'*Ulva rigida*

Afin de dépolymériser la fraction **PROT1**, différentes techniques peuvent être mises en œuvre : la dépolymérisation physico-chimique ou la dépolymérisation par voie enzymatique. L'hydrolyse acide à chaud permet d'obtenir des peptides de bas poids moléculaire rapidement mais apporte trop de sel et l'hydrolyse acide supportée est un procédé sans solvant mais fonctionnant difficilement (risque de précipitation des protéines au sein de la colonne). Le choix d'une hydrolyse enzymatique paraît donc être le plus adapté. De plus, de nombreux cocktails d'enzymes protéolytiques d'origines végétale, animale ou microbienne existent et ont été utilisés avec succès pour produire des hydrolysats peptidiques (Chalamaiah et al. 2018). L'un de ces cocktails très couramment utilisé est Flavourzyme[®], connu pour générer des peptides de bas poids moléculaire. Ce cocktail contient huit enzymes provenant d'*Aspergillus oryzae* : 2 aminopeptidases, 2 dipeptidyl peptidases, 3 endopeptidases et une α -amylase (Merz et al. 2015).

Pour déterminer les conditions appropriées d'obtention de peptides de poids moléculaire ciblé, nous avons réalisé une cinétique d'hydrolyse de la fraction **PROT1** en respectant un protocole déjà mis au point au sein du laboratoire. Les différentes étapes de ce protocole appliqué aux fractions **PROT1-UI** (*Ulva intestinalis*) et **PROT1-UR** (*Ulva rigida*) sont résumées sur la *figure 71* :

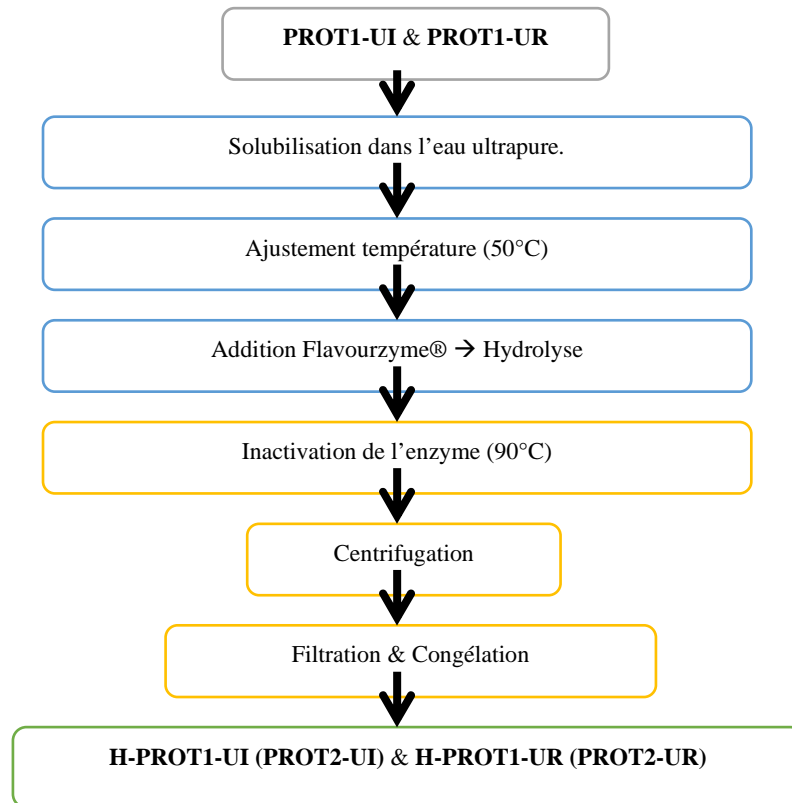


Figure 71 : Etapes successives effectuées afin d'hydrolyser les fractions PROT1-UI et PROT1-UR pour produire H-PROT1-UI et H-PROT1-UR

Chaque prélèvement de la cinétique a été analysé par HPL-SEC au moyen d'une colonne TSKGel 3000SW. Les profils chromatographiques obtenus au-cours de la cinétique d'hydrolyse de **PROT1-UI** provenant d'*Ulva intestinalis* sont représentés sur la *figure 72*. A t_{0h}, ils mettent en évidence un pic majoritaire représentant une population protéique ayant un poids moléculaire de l'ordre de 22 kDa. Concernant les temps d'hydrolyses t_{1h} et t_{2h}, un franc décalage du pic sur la droite du chromatogramme est observé, prouvant la diminution du poids moléculaire des espèces protéiques. Trois pics majoritaires représentant trois populations protéiques se distinguent :

- Une population protéique éluée à 13,64 min ayant un poids moléculaire de l'ordre de 7 kDa,
- Une population protéique éluée à 14,4 min ayant un poids moléculaire de l'ordre de 4,1 kDa,
- Une population protéique éluée à 15,20 min ayant un poids moléculaire de l'ordre de 2 kDa.

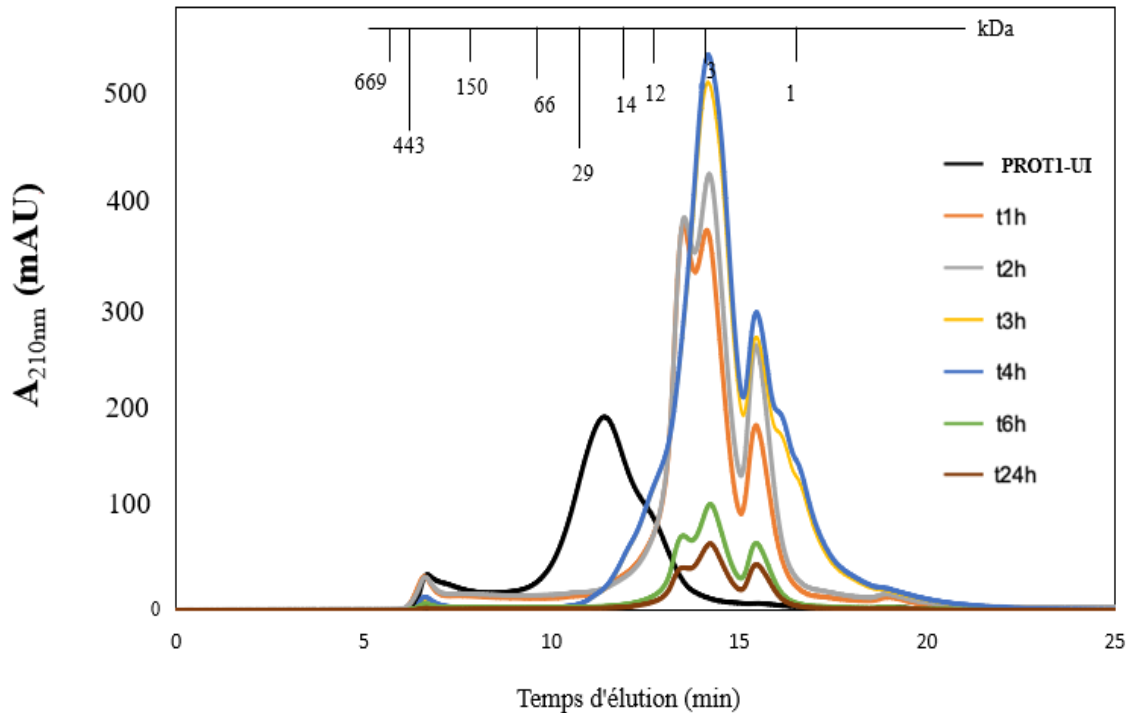


Figure 72: Suivi cinétique par HPL-SEC de l'hydrolyse enzymatique de la fraction PROT1-UI catalysée par le cocktail Flavourzyme®: utilisation d'une colonne TSKGel 3000SW (60 cm \times 7.5 mm), élué à 1 ml/min dans tampon phosphate 0.1 M, pH 7.

Concernant les temps d'hydrolyses t_{3h} et t_{4h} , les profils obtenus sont superposables. En effet, nous observons une population protéique à 4,1 kDa ayant un signal plus important qu'à t_{1h} ou t_{2h} . En revanche, le pic représentant la population protéique ayant un poids moléculaire de 7 kDa a disparu sous l'effet de l'hydrolyse enzymatique, au profit d'une population protéique de 4,1 kDa et de peptides de bas poids moléculaires caractérisés par un épaulement du pic correspondant à environ 14,5 min, et l'augmentation du pic élué à 19 min. Parallèlement, nous notons la diminution quasi-totale du pic élué à 7 min, représentant les protéines de hauts poids moléculaires. Les temps d'hydrolyses t_{6h} et t_{24h} sont différents des autres profils. En effet, ils présentent une diminution très nette des pics représentant les trois populations protéiques (7, 4,1 et 2 kDa). Cette diminution peut s'expliquer par une hydrolyse enzymatique poussée, libérant des acides aminés libres ou des peptides de très faible taille, non détectés à 210 nm.

Afin de confirmer ces analyses HPL-SEC, une analyse par électrophorèse SDS-PAGE a été effectuée pour la fraction **PROT1-UI** et les hydrolysats **H-PROT1-UI** (figure 73). Les bandes correspondant à des protéines ayant un PM entre 20 et 25 kDa et inférieures à 10 kDa sont observées ainsi que la présence d'une traînée caractéristique d'une multitude de protéines non résolues. Une bande intense au niveau du puit de chargement révèle des protéines de hauts poids moléculaires. En ce qui concerne les hydrolysats **H-PROT1-UI** (**4h**, **6h** et **24h**), la disparition de la traînée protéique laisse penser que l'action hydrolytique des enzymes a permis la dépolymérisation de ces protéines. La bande majoritaire correspondant à des protéines entre 20 et 25 kDa diminue d'intensité au cours du temps pour quasiment disparaître après 24 h d'hydrolyse. Ces résultats confirment les analyses HPL-SEC. Il en est de même pour la population protéique de poids moléculaire inférieur à 10 kDa, qui devient plus résolue et se

décale encore vers les bas poids moléculaires au cours du temps.

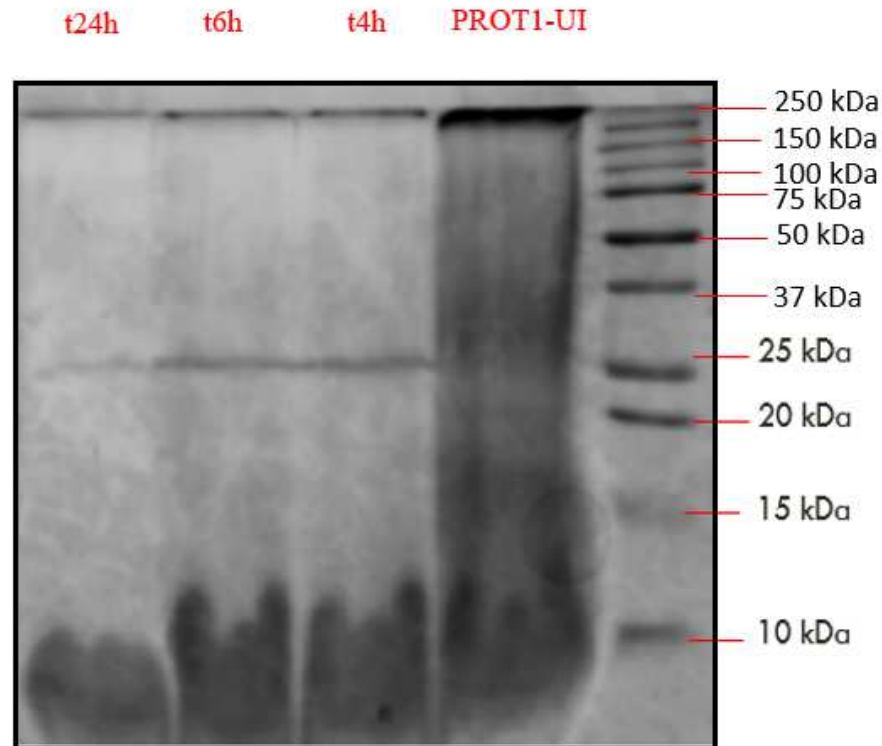


Figure 73 : Suivi cinétique par électrophorèse SDS-PAGE de l'hydrolyse enzymatique de la fraction PROT1-UI catalysée par le cocktail Flavourzyme® (gel d'acrylamide, 4-20%).

Nous avons ensuite appliqué le même protocole d'hydrolyse enzymatique à la fraction **PROT1-UR** provenant d'*Ulva rigida*. Le profil chromatographique obtenu par HPL-SEC de la cinétique d'hydrolyse de **PROT1-UR** est représenté sur la *figure 74*. Il met en évidence un pic majoritaire représentant une population protéique de poids moléculaire majoritaire supérieur à 669 kDa, un massif assez large représentant une population protéique ayant un PM majoritaire de 5 kDa avec des variations de 30 à 3 kDa et un pic représentant une population peptidique de poids moléculaire inférieur à 1 kDa. Dans les premiers temps de l'hydrolyse, l'intensité du pic représentant la population protéique de poids moléculaire supérieur à 669 kDa augmente contre toute attente pour atteindre un maximum à t2h. Cette augmentation peut toutefois s'expliquer par l'augmentation de la solubilité aqueuse de protéines de très haut poids moléculaire engendrée par leur dépolymérisation.

Concernant les autres populations protéiques, un décalage des pics sur la droite du chromatogramme s'opère pour donner des profils d'hydrolysats **H-PROT1-UR** de 1 à 6 h d'hydrolyse comprenant un pic élué à 7 min (PM > 669 kDa) d'intensité faiblissant, un pic élué à 14 min (PM \approx 4 kDa) et un pic élué à 15 min (PM \approx 2 kDa).

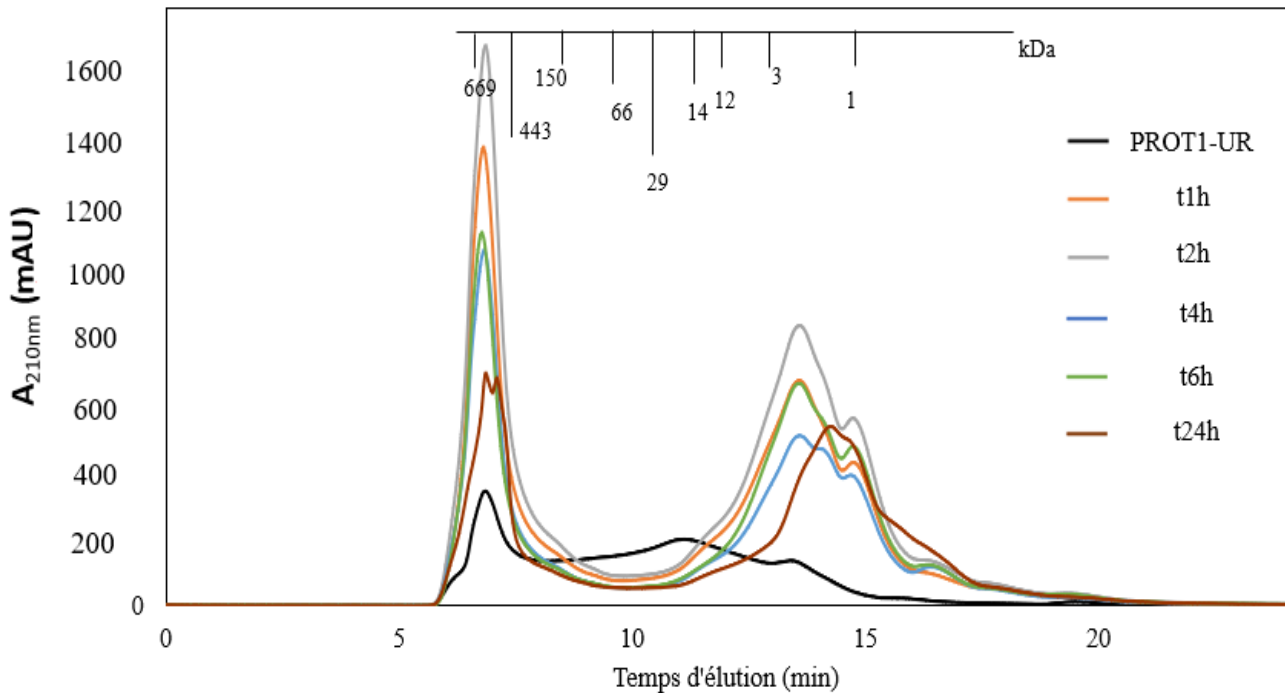


Figure 74: Suivi cinétique par HPL-SEC de l'hydrolyse enzymatique de la fraction PROT1-UR catalysée par le cocktail Flavourzyme® : utilisation d'une colonne TSKGel 3000SW (60 cm × 7.5 mm), élué à 1 ml/min dans tampon phosphate 0.1 M, pH 7.

Concernant le profil de **H-PROT1-UR_{24h}**, il montre une diminution importante mais non aboutie du pic élué à 7 min ainsi que son dédoublement au profit d'une population protéique de PM majoritaire plus faible (≈ 150 kDa). Le pic élué à 14 min a quant à lui quasiment disparu pour laisser place à des populations peptidiques de faible PM ($t_R < 15$ min : PM < 2 kDa).

Afin de confirmer ces analyses HPL-SEC, nous avons caractérisé les hydrolysats par électrophorèse SDS-PAGE (figure 75). Les bandes présentes initialement correspondant à des protéines de PM proches de 10 et 15 kDa sont logiquement retrouvées dans la fraction **PROT1-UR**. Comme pour la fraction **PROT1-UI**, une traînée caractéristique de la présence d'une multitude de protéines non résolues est également notée sur l'intégralité de la séparation, ainsi qu'une bande intense au niveau du puit de chargement, caractéristique de protéines de hauts poids moléculaires n'ayant pas pu migrer en raison du maillage serré.

En ce qui concerne les hydrolysats **H-PROT1-UR (4h, 6h et 24h)**, nous remarquons la disparition de la traînée protéique, laissant penser que l'action hydrolytique des enzymes a permis la dépolymérisation de ces protéines.

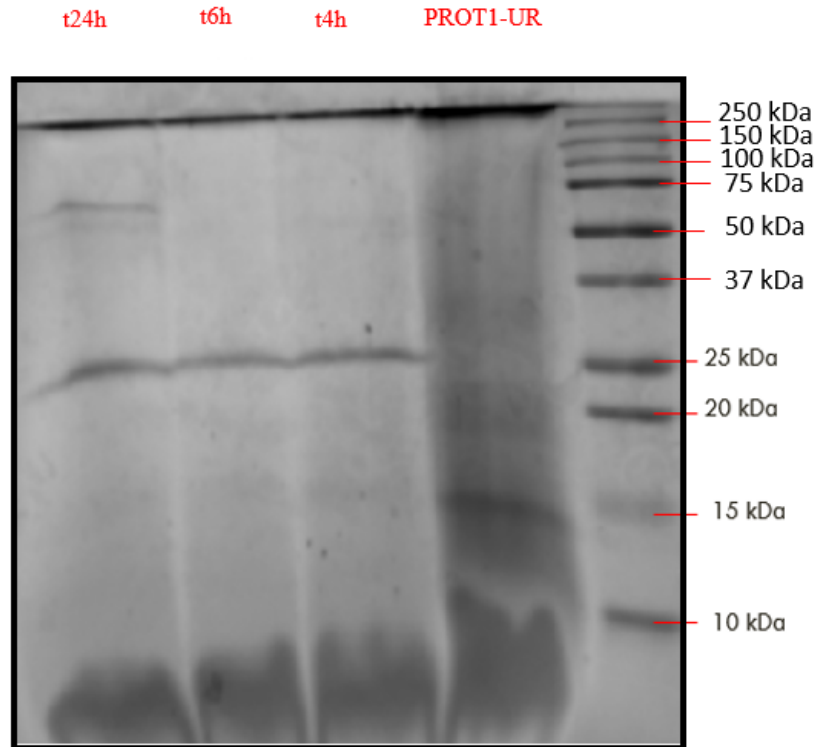


Figure 75 : Suivi cinétique par électrophorèse SDS-PAGE de l'hydrolyse enzymatique de la fraction PROT1-UR catalysée par le cocktail Flavourzyme® (gel d'acrylamide, 17%).

L'hydrolyse de la fraction **PROT1-UR** a pour effet la disparition de la traînée protéique et de ces deux bandes majoritaires, ainsi que l'apparition d'une bande très intense et diffuse correspondant à des protéines de PM très inférieurs à 10 kDa. Parallèlement, une bande proche de 27 kDa apparaît de plus en plus intense. Ces deux populations protéiques pourraient correspondre aux populations protéiques de 12 kDa et de 27 kDa retrouvées chez *Ulva rigida* par Fleurence et *al.* (1995). Enfin, deux bandes situées au niveau du marqueur de taille de 75 et 100 kDa sont notées uniquement après 24 h d'hydrolyse, ce qui est cohérent avec notre observation préalable par HPL-SEC d'un pic dédoublé.

b. Obtention et caractérisation structurale de fractions peptidiques de bas poids moléculaire provenant d'*Ulva intestinalis* et *Ulva rigida*

Dans le cadre de cette thèse, un des objectifs est de produire un hydrolysats peptidique contenant des peptides de bas poids moléculaire susceptibles de pouvoir traverser les barrières intestinale et hémato-encéphalique. Seuls les di- et tri-peptides (≈ 350 Da) vont être absorbés directement au niveau des bordures en brosse de l'intestin (Cassilde. 2016). Compte-tenu du mode d'ingestion par voie orale choisi pour l'étude *in vivo* de ce projet, il était nécessaire de prendre en considération l'hydrolyse acide et enzymatique subie par les fractions peptidiques lors de leur passage dans le tractus gastro-intestinal (Huneau et *al.* 1997). Afin de caractériser la distribution du poids moléculaire des protéines et peptides produits dans les hydrolysats **H-PROT1**, ceux-ci ont été filtrés au moyen de membranes de filtration présentant des seuils de

coupure différents (3 kDa, 10 kDa et 50 kDa). La fraction **PROT1-UI** comporte très majoritairement des protéines de PM compris entre 50 et 10 kDa (85%), seulement une faible proportion de protéines de PM supérieur à 50 kDa (36%) et une proportion de protéines et peptides ayant un poids moléculaire inférieur à 10 kDa (15%) (*figure 76*). Le taux de recouvrement obtenu dans ce cas est très largement supérieur à 100%, ce qui est probablement dû à une limitation de la méthode de quantification utilisée. Bien que cela tende à diminuer le degré de confiance qui peut être accordé à ce résultat, ce dernier corrobore la caractérisation de cette fraction par HPL-SEC et SDS-PAGE.

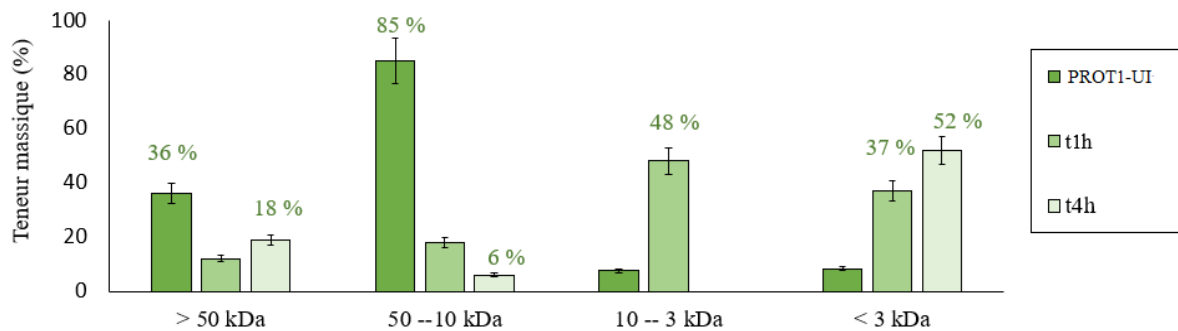


Figure 76 : Distribution du poids moléculaire des protéines et peptides présents dans la fraction **PROT1-UI** et les hydrolysats **H-PROT1-UI1h**, **H-PROT1-UI2h** et **H-PROT1-UI4h**.

L'hydrolyse enzymatique de la fraction **PROT1-UI** donne rapidement lieu à la dépolymérisation des espèces protéiques de PM supérieur à 10 kDa au profit de protéines de PM inférieur et surtout de peptides de moins de 3 kDa, présents respectivement à hauteur de 22% et 60% après 2 h. Seul le fait que les protéines de PM supérieur à 50 kDa soient retrouvées en plus grande proportion dans l'hydrolysats **H-PROT1-UI4h** (19%), que dans les hydrolysats **H-PROT1-UI2h** et **H-PROT1-UI3h** peut sembler incohérent. Cela peut s'expliquer toutefois par la possibilité que certaines protéines de très grande taille, insolubles dans leur état natif, voient leur solubilité augmenter au cours de leur digestion enzymatique, une fois leur taille réduite.

La fraction **PROT1-UR** a donné des résultats divergents (*figure 77*), car cette fraction comporte presque exclusivement, à hauteur de 85%, des protéines présentant un PM supérieur à 50 kDa, associées à de faibles proportions de protéines de PM compris entre 10 et 50 kDa (6%) et inférieur à 3 kDa (20%). Ces résultats sont cohérents avec les analyses HPL-SEC et SDS-PAGE de cette fraction. Les fractions **H-PROT1-UR2h** et **H-PROT1-UR4h** contiennent respectivement 48% et 10% de protéines de PM supérieur à 50 kDa pour 38% et 70% de peptides de PM inférieur à 3 kDa, ce qui montre que l'hydrolyse enzymatique a mené assez rapidement à la dépolymérisation de près de 90% des protéines natives (*figure 75*).

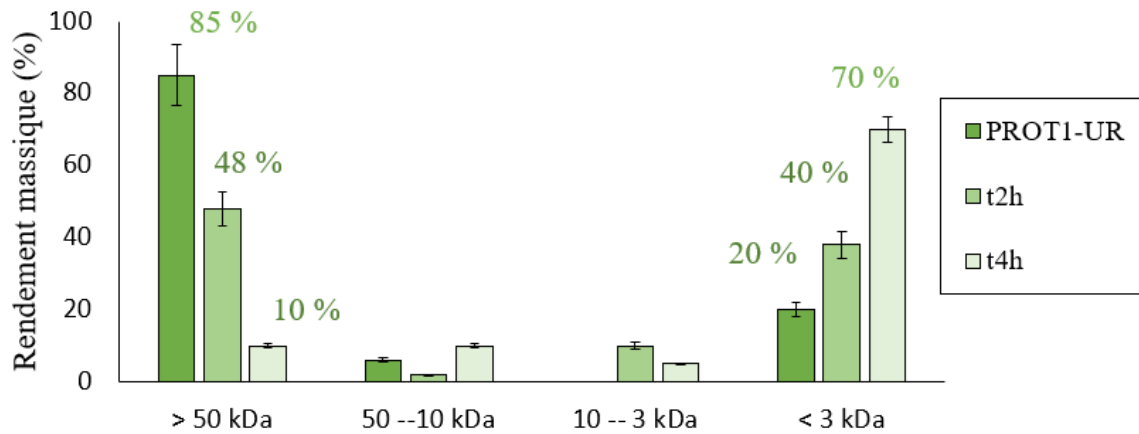


Figure 77: Distribution du poids moléculaire des protéines et peptides présents dans la fraction PROT1-UR et les hydrolysats H-PROT1-UR2h et H-PROT1-UR4h.

Les peptides bioactifs sont généralement composés de 2 à 20 acides aminés (entre 350 et 2200 kDa), et il est important que les fractions sélectionnées, lors de ce projet, contiennent une majorité de peptides ayant un PM dans ces intervalles. Ces fractions doivent aussi contenir des peptides de bas poids moléculaire susceptibles de pouvoir traverser les barrières intestinale et hémato-encéphalique comme les di- et tri-peptides (≈ 350 Da) (Cassilde. 2016). Ainsi, dans le choix des temps d'hydrolyse pour obtenir les hydrolysats peptidiques, il est important de tenir compte de l'hydrolyse acide et enzymatique subies par les fractions peptidiques lors de leur passage dans le tractus gastro-intestinal (Huneau *et al.* 1997).

Pour la fraction **PROT1-UR**, les temps d'hydrolyse enzymatique 6h et 24h étant trop avancés au point d'aboutir à la libération de très nombreux acides aminés, les hydrolysats **H-PROT1-UR2h** et **H-PROT1-UR4h** ont été sélectionnés. La proportion de protéines et/ou peptides ayant un poids moléculaire inférieur à 3 kDa paraissant trop importante au sein de la fraction **H-PROT1-UR4h**, cela pourrait conduire à la production gastro-intestinale de peptides de taille trop réduite lors de leur application *in vivo*. La fraction **H-PROT1-UR2h** semble être un bon compromis. Elle contient une proportion relative de peptides (< 3 kDa) associée à une proportion importante de protéines de PM inférieur à 50 kDa, permettant d'envisager leur digestion gastro-intestinale dans le modèle animal et ainsi la libération de peptides bioactifs.

Dans la même logique, l'analyse des hydrolysats de la fraction **PROT1-UI** a conduit à choisir l'hydrolysate **H-PROT1-UI1h**, qui semble représenter un bon compromis du fait de sa teneur en peptides (< 3 kDa), et protéines de PM compris entre 10 et 3 kDa.

La capacité d'un peptide à présenter une activité anti-inflammatoire, et plus largement immunomodulatrice, peut dépendre de sa composition en acides aminés, de sa séquence peptidique, de sa taille, de sa charge ou encore de son hydrophobicité (Berthou *et al.* 1987; Jacquot *et al.* 2010). Partant de ce constat, les peptides présents dans les fractions **PROT2-UI** et **PROT2-UR** et leur composition en acides aminés ont été identifiés, par chromatographie liquide à ultra-haute pression associée à la spectrométrie de masse haute résolution (UHPLC-MS HR). Une fois lyophilisées, les fractions ont été filtrées au moyen d'une membrane d'ultrafiltration ayant un seuil de coupure de 50 kDa (*figure 78*). Cette étape nous a permis de nous débarrasser des protéines de haut poids moléculaire, pouvant altérer la sensibilité et la

résolution de l'analyse. Les fractions obtenues, nommées **PROT2-UI**_{<50 kDa} et **PROT2-UR**_{<50 kDa} ont ensuite été lyophilisées jusqu'à leur analyse UHPLC-MS HR.

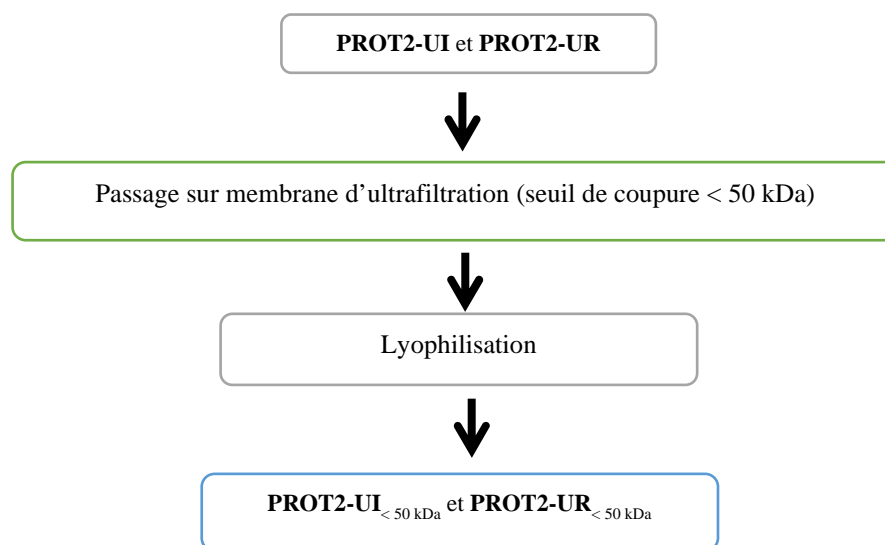


Figure 78 : Différentes étapes conduisant à la production des fractions **PROT2-UR** <50 kDa et **PROT2-UI** <50 kDa

Une fois produite et lyophilisée, la composition peptidique et la composition en acides aminés des fractions **PROT2-UI**_{<50 kDa} et **PROT2-UR**_{<50 kDa} ont été caractérisées. Pour cela, les fractions **PROT2-UI**_{<50 kDa} et **PROT2-UR**_{<50 kDa} ont été analysées par spectrométrie de masse (ESI-Q-TOF) après séparation par UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography).

Le *tableau 17* répertorie les peptides identifiés dans la fraction **PROT2-UI**_{<50 kDa}. 92 peptides ont été identifiés, et plus précisément 14 dipeptides, 5 tripeptides, 15 peptides contenant 4 acides aminés, 15 peptides contenant 5 acides aminés, 7 peptides contenant 6 acides aminés, 10 peptides contenant 7 acides aminés, 9 peptides contenant 8 acides aminés, 4 peptides contenant 10 acides aminés, 6 peptides de 11 acides aminés, 1 peptide de 12 acides aminés, 9 peptides de 13 acides aminés, 1 peptide de 14 et 15 acides aminés.

Les acides aminés majoritaires composant ces différents peptides provenant de la fraction **PROT2-UI** sont la leucine et l'isoleucine (17,1%) et l'alanine (9,7%). D'autres acides aminés sont retrouvés en proportions égales : la glycine (7,6%), l'acide glutamique (7,6%), l'acide aspartique (7,9%), la tyrosine (7,4%), la thréonine (7,9%) et la sérine (7,1%).

Tableau 17 : Composition en peptide et en acide aminé de la fraction **PROT2-UI**. * représentant les acides aminés non élucidés et () représentant les peptides indéterminés

Ordre	Temps de rétention (min)	Ion	Masse monoisotopique expérimentale (Da)	Précision (ppm)	Acides aminés ou peptides
1	2,58	[M + H] ⁺	233,1130	0,86	VD
2	3,20	[M + H] ⁺	508,1899	2,56	EGESS
3	3,81	[M + H] ⁺	247,1284	2,02	VE
4	4,16	[M + H] ⁺	246,1456	2,84	I/LN
5	5,65	[M + H] ⁺	247,1289	2,02	I/LD
6	5,65	[M + H] ⁺	247,1294	2,02	EV
7	6,67	[M + H] ⁺	294,1545	2,72	I/L-hexose
8	8,21	[M + H] ⁺	261,1452	0,77	I/LE
9	8,81	[M + H] ⁺	261,1452	0,77	I/LE
10	9,57	[M + H] ⁺	590,2798	2,88	ETVNQ
11	9,80	[M + H] ⁺	404,2132	1,98	I/LSAN
12	10,40	[M + H] ⁺	419,2135	0,00	TVAE
13	10,70	[M + H] ⁺	449,2243	1,56	TEVT
14	10,93	[M + H] ⁺	328,1394	0,61	F-hexose
15	11,32	[M + H] ⁺	418,2293	0,96	I/LSAQ
16	11,52	[M + H] ⁺	555,2410	0,18	TGYTN
17	11,52	[M + H] ⁺	203,14	4,43	AI/L
18	11,83	[M + H] ⁺	546,2520	0,18	DAI/LNN
19	12,46	[M + H] ⁺	502,2625	1,00	AI/LNGQ
20	12,66	[M + H] ⁺	295,1294	1,69	FE
21	12,87	[M + H] ⁺	475,2515	0,84	AI/LSNA
22	13,41	[M + H] ⁺	367,1506	0,27	W-hexose
23	14,27	[M + H] ⁺	350,1740	1,43	I/LMS
24	14,48	[M + H] ⁺	526,2163	4,18	SAYDA
25	14,48	[M + H] ⁺	526,2163	4,18	*DADA
26	15,29	[M + H] ⁺	440,1667	0,68	EYY
27	16,18	[M + H] ⁺	403,2188	0,07	DVVA
28	16,65	[M + H] ⁺	237,1241	3,08	AF
29	17,22	[M + H] ⁺	205,0982	2,44	W
30	17,60	[M + H] ⁺	229,1552	2,18	I/LP
31	18,01	[M + H] ⁺	492,2662	0,61	SI/LTTA
32	19,09	[M + H] ⁺	458,2607	0,59	I/LPQT
33	19,09	[M + H] ⁺	458,2607	0,59	QPI/LT
34	19,98	[M + H] ⁺	295,1659	2,03	I/LY
35	21,39	[M + H] ⁺	302,2077	0,66	I/LI/LG
36	21,76	[M + H] ⁺	416,2517	1,20	*GSI/LA
37	21,76	[M + H] ⁺	416,2517	1,20	NVI/LA
38	22,01	[M + H] ⁺	409,2078	1,00	VGAY
39	22,01	[M + H] ⁺	409,2078	1,00	I/LNY
40	22,25	[M + H] ⁺	552,2316	1,81	EAEFG
41	22,64	[M + H] ⁺	411,7227	6,07	YTI/LDPP*
42	22,64	[M + H] ⁺	295,1654	0,34	YI/L
43	23,03	[M + 2H] ²⁺	720,3186	0,99	QAAEAAESGDFKSE
44	23,25	[M + 2H] ²⁺	841,8622	-	*QSDWSEAEAAHS
45	23,45	[M + H] ⁺	777,3397	0,40	NQAAEAAESGDESKF
46	23,65	[M + H] ⁺	459,2179	3,64	EEYTFTK
47	23,65	[M + H] ⁺	459,2179	3,64	KFTTYEE
48	23,65	[M + H] ⁺	459,2179	3,64	KFYTTEE
49	23,85	[M + H] ⁺	550,2878	1,13	(I/L)GTYP
50	24,12	[M + H] ⁺	790,4323	2,21	TI/LATI/LSNA
51	24,32	[M + H] ⁺	329,1500	1,28	YF
52	24,53	[M + H] ⁺	373,2276	3,22	KDTVI/LI/LG
53	24,53	[M + 2H] ²⁺	766,8573	-	*KDI/LI/LI/L*
54	25,18	[M + H] ⁺	401,2756	0,72	VVAI/L

55	25,18	[M + H] ⁺	600,3360	1,33	SPGGI/LGI/L
56	25,18	[M + H] ⁺	600,3360	1,33	SNI/LPGI/L
57	25,58	[M + H] ⁺	873,3639	1,57	(YG)YGDI/LDA
58	25,58	[M + H] ⁺	873,3639	1,57	(YG)GI/LDYDA
59	25,58	[M + H] ⁺	873,3639	1,57	(YG)DI/LGYDA
60	25,58	[M + H] ⁺	873,3639	1,57	(YG)DYGI/LDA
61	25,58	[M + H] ⁺	873,3639	1,57	(DI/L)GYGYDA
62	25,86	[M + H] ⁺	687,2986	0,17	DI/LGYGY
63	26,07	[M + H] ⁺	579,3143	0,98	NVI/LAY
64	26,07	[M + 2H] ²⁺	590,7799	3,71	QEYENI/LI/LGSQ
65	26,07	[M + H] ⁺	555,2821	1,31	YI/LYP
66	26,73	[M + H] ⁺	431,2497	0,86	DI/LAI/L
67	27,04	[M + H] ⁺	401,2756	0,72	I/LVGI/L

Tableau 18 : Composition en peptide et en acide aminé de la fraction **PROT2-UR**, * représentant les acides aminés non élucidés,

Ordre	Temps de rétention (min)	Ion	Masse monoisotopique expérimentale (Da)	Précision (ppm)	Peptides ou acides aminés
1	1,33	[M + H] ⁺	175,12	4,73	R
2	1,69	[M + H] ⁺	219,0981	2,28	AE
3	1,84	[M + H] ⁺	249,1086	2,007	TE
4	1,92	[M + H] ⁺	217,119	3,22	TP
5	1,92	[M + H] ⁺	232,1298	5,6	TN
6	1,92	[M + H] ⁺	277,1032	6,85	EE
7	2,25	[M + H] ⁺	205,1189	7,8	SV
8	2,57	[M + H] ⁺	233,138	1,28	DV
9	3,39	[M + H] ⁺	189,1237	4,75	VA
10	3,73	[M + H] ⁺	247,1298	6,06	VE
11	4,13	[M + H] ⁺	205,1187	6,82	VS
12	4,42	[M + H] ⁺	189,1239	3,17	AV
13	5,84	[M + H] ⁺	247,1295	0,8	ID
14	6,39	[M + H] ⁺	182,0815	1,09	Y
15	6,39	[M + H] ⁺	247,1295	0,89	LD
16	7,27	[M + H] ⁺	297,1089	1,009	DY
17	8,52	[M + H] ⁺	203,1395	0,98	AI/AL
18	9	[M + H] ⁺	261,1454	4,21	IE
19	9,75	[M + H] ⁺	261,1454	4,21	LE
20	11,6	[M + H] ⁺	166,0865	1,2	F
21	12,77	[M + H] ⁺	247,1295	4,85	DI
22	12,82	[M + H] ⁺	281,1139	5,69	DF
23	13,49	[M + H] ⁺	243,1346	1,64	SH
24	14,12	[M + H] ⁺	247,1295	4,85	DL
25	15,34	[M + H] ⁺	243,1346	12,3	HS
26	15,81	[M + H] ⁺	295,1292	5,76	WS
27	16,89	[M + H] ⁺	223,1082	0,44	FG
28	17,55	[M + H] ⁺	281,15	6,04	VY
29	18,3	[M + H] ⁺	253,1188	5,92	SF
30	19,16	[M + H] ⁺	223,1082	0,44	GF
31	19,54	[M + H] ⁺	279,1342	3,22	YP
32	19,95	[M + H] ⁺	229,1552	0,43	IP/LP
33	20	[M + H] ⁺	300,1917	1,33	AIP/ALP
34	21,38	[M + H] ⁺	229,1552	3,92	IP/LP
35	21,96	[M + H] ⁺	314,2079	5,09	VVP
36	22,5	[M + H] ⁺	263,1396	4,94	FP
37	22,89	[M + H] ⁺	295,1656	6,77	IY/LY/YI/YL
38	23,43	[M + H] ⁺	431,2138	0,93	SEVP/SVEP
39	23,77	[M + H] ⁺	263,1393	3,8	FP
40	23,77	[M + H] ⁺	590,2678	4,23	DVLED/VDLED

41	24,34	[M + H] ⁺	520,3126	0,57	LPPPP/IPPPP
42	24,54	[M + H] ⁺	328,233	3,04	LVP/IVP
43	24,97	[M + H] ⁺	304,166	5,58	VW/WV
44	25,21	[M + H] ⁺	385,2448	3,89	PGVL/GPVL
45	25,21	[M + H] ⁺	586,3079	1,02	LLVLE
46	25,82	[M + 2H] ²⁺	818,881	-	**TELAVGTDTSQDQSP
47	27,09	[M + H] ⁺	342,24	4,96	IILLP/ILP/LIP/IIP
48	27,27	[M + 2H] ²⁺	665,7678	-	*****EPEVE
49	27,72	[M + H] ⁺	580,2971	6,54	TVLTF
50	30	[M + H] ⁺	665,7678 / 1330,5278	-	GPVE*****ADL
51	30,41	[M + 2H] ²⁺	805,4255	13	PSGLEAPQKVLVDQ/SPGLEAPQKVLVDQ
52	30,69	[M + 2H] ²⁺	566,2823	13,24	EVLESGQQLE/DLESGQQLE

Le *tableau 18* répertorie les peptides identifiés dans la fraction **PROT2-UR**<50 kDa. 52 peptides ont pu être identifiés et plus précisément 37 dipeptides, 4 tripeptides, 3 peptides comportant 4 acides aminés et 9 peptides comportant 5 acides aminés ou plus. Des acides aminés libres ont aussi été identifiés tels que l'arginine. La fraction **PROT2-UR**<50 kDa contient donc en majorité des dipeptides. Cette répartition est différente de celle obtenue pour **PROT2-UI**<50 kDa. En effet, la fraction **PROT2-UR**<50 kDa contient en majorité des peptides de 4 à 6 acides aminés. Les acides aminés majoritaires composant ces différents peptides sont la leucine/l'isoleucine (14,8%), la valine (14,1%), la proline (13,4%) et l'acide glutamique (10,7%) (*figure 79*). Ces résultats sont cohérents avec la composition en acides aminés de la fraction **PROT1-UR** qui est composée en majorité de leucine, d'isoleucine, de valine et de proline. Ces acides aminés sont connus pour rentrer dans la composition de peptides présentant des activités anti-inflammatoires (Chalamaiah et al. 2018). 17 peptides présents dans la fraction **PROT2-UR** contiennent de la proline, 20 peptides contiennent de la valine, 22 peptides contiennent de la leucine ou de l'isoleucine et 13 peptides contiennent de l'acide aspartique. 6 peptides contiennent au moins 2 de ces acides aminés, 5 en contiennent au moins 3 et 6 en contiennent au moins 4. La composition en acides aminés de la fraction **PROT2-UR** est différente de celle retrouvée chez **PROT2-UI**. Uniquement la leucine et l'isoleucine sont présentes majoritairement dans les deux fractions (*figure 79*).

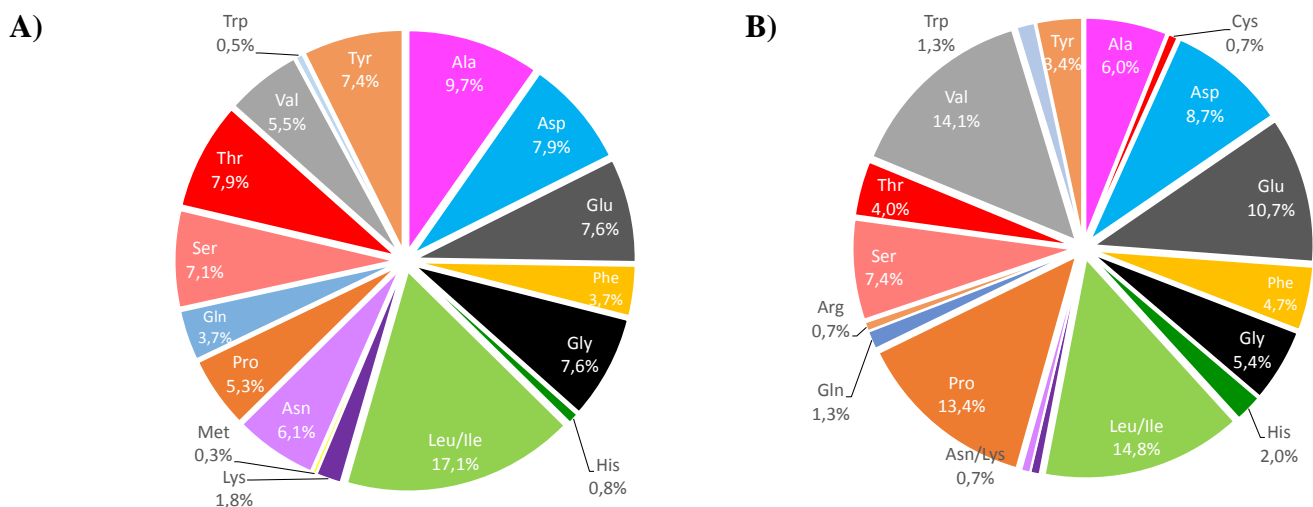


Figure 79: Compositions en acides aminés des peptides séquencés de la fraction **PROT2-UI**, issue d'*Ulva intestinalis* (53 peptides séquencés) (A), et de la fraction **PROT2-UR**, issue d'*Ulva rigida* (86 peptides séquencés) (B).

Les capacités anti-inflammatoires des peptides vont dépendre de leur composition en acides aminés, de leur charge, ou encore de l'ordre des acides aminés dans le peptide (Chalamaiah et al. 2018). Généralement, ils sont composés de 2 à 10 acides aminés et sont de nature hydrophobe (alanine, isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane, valine, tyrosine) (Chalamaiah et al. 2018). Les fractions **PROT2-UI** et **PROT2-UR** possèdent en grand nombre des peptides de 2 à 10 acides aminés contenant en majorité de la leucine/isoleucine, de l'alanine, de la proline ou encore de la valine.

Les acides aminés les plus fréquemment retrouvés dans les peptides immunomodulateurs sont des acides aminés hydrophobes tels que la glycine (G), la valine (V), la leucine (L), la proline (P) la phénylalanine (F), mais aussi des acides aminés anioniques comme l'acide glutamique (Q) ou aromatiques comme la tyrosine (Y).

On retrouve, dans les fractions **PROT2-UI** et **PROT2-UR**, de l'acide glutamique en forte quantité, entouré généralement d'acides aminés hydrophobes. Il a été démontré que des acides aminés hydrophobes positionnés à côté d'un ou plusieurs résidus de glutamine, d'acide glutamique, de tyrosine, de tryptophane (W), de cystéine (C), d'asparagine (N) ou d'acide aspartique (D), potentialisent les activités immunomodulatrices de peptides (He et al. 2015; Vo et al. 2013; Hou et al. 2012; Kim et al. 2013). La composition des fractions **PROT2-UI** et **PROT2-UR** font donc d'elles de bonnes candidates pour être testées en tant qu'extrait anti-inflammatoire (He et al. 2015; Vo et al. 2013; Kim et al. 2013; Hou et al. 2012). Après lyophilisation, la composition biochimique des fractions **PROT2-UI** <50 kDa et **PROT2-UR** <50 kDa a été caractérisée. Les résultats obtenus sont donnés dans le *tableau 19*.

Tableau 19 : Composition biochimique des fractions **PROT2-UR** <50 kDa et **PROT2-UI** <50 kDa

<i>Fraction</i>	Teneurs massiques					
	Protéines	Sucres totaux	Acides uroniques	Polyphénols	Lipides	Equivalent sulfates
PROT2-UI	32 ± 5%	10 ± 4%	1 ± 6%	< 1%	< 1 %	13 ± 2%
PROT2-UR	45 ± 7%	20 ± 6%	5 ± 2%	< 1%	< 1 %	16 ± 2%

La fraction **PROT2-UI** possède une teneur en protéines moins importante que **PROT2-UR** (32 % contre 45 %). De même, la teneur en polysaccharides totaux est moins importante chez **PROT2-UI** (10% contre 20%). Ces fractions hydrolysées contiennent moins de polysaccharides et de protéines que les fractions natives (**PROT1-UI** et **PROT1-UR**). Ce fait peut s'expliquer par le passage des échantillons sur une membrane de filtration, éliminant les molécules ayant un PM supérieur à 50 kDa, mais aussi par le fait que le dosage de Lowry ne permet pas de doser les acides aminés totaux et les dipeptides libérés lors de l'hydrolyse enzymatique.

c. Dépolymérisation des fractions polysaccharidiques d'*Ulva intestinalis* et d'*Ulva rigida*

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous devons proposer des fractions peptidiques (**PROT2-UI** et **PROT2-UR**), mais aussi des fractions polysaccharidiques de bas poids moléculaire. Contrairement à la méthode appliquée pour la dépolymérisation des fractions protéiques, la possibilité d'utiliser des enzymes hydrolytiques a été ici écartée en raison de la faible disponibilité de ce type de biocatalyseur et du coût élevé de leur application. Nous avons donc adapté une méthode de dépolymérisation hydrolytique par catalyse acide supportée, déjà mise au point au sein du laboratoire pour diminuer le poids moléculaire moyen de la fraction polysaccharidique d'*Ulva rigida* (**PSA-UR**) (Adrien. 2016).

Cette méthode, impliquant l'utilisation d'une résine échangeuse d'ions, cationique forte, de type AMBERLYST™ 15 WET, à 80°C, ne nécessite pas l'usage d'acide libre en solution et permet de respecter la pratique de la chimie verte souhaitée et appliquée par l'entreprise Seprosys pour son procédé de fractionnement. La fraction **PSA-UR**, de poids moléculaire moyen de 56 kDa, avait ainsi pu être réduite après 24 h à environ 4 kDa, au sein d'une nouvelle fraction dénommée **PSB-UR**. Sur la base de ces résultats, cette méthode a été transposée afin de dépolymériser la fraction **PSA-UI**. La dépolymérisation a été suivie pendant 24 h et contrôlée par analyse HPL-SEC (*figure 80*).

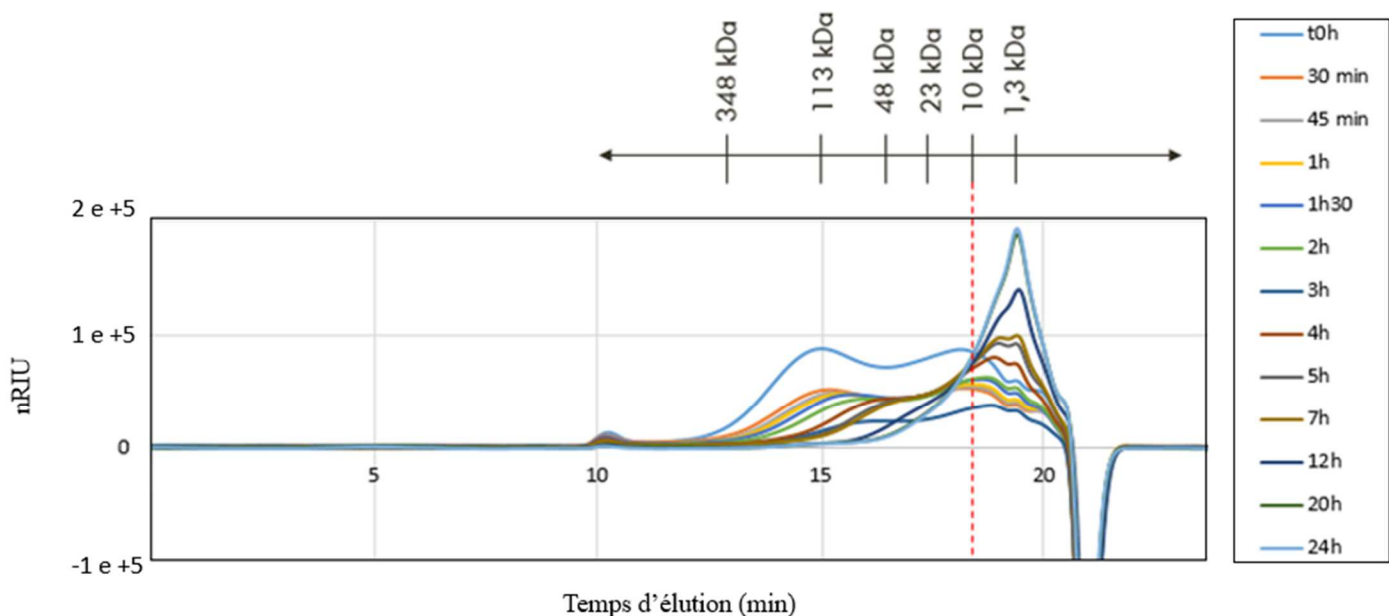


Figure 80: Suivi cinétique par HPL-SEC de la dépolymérisation de la fraction PSA-UI obtenue par hydrolyse acide supportée menée à 80°C au moyen d'une résine cationique forte (AMBERLYST™ 15 WET). Conditions HPL-SEC : colonnes TSK Gel 5000-4000PW (7.5 mm x 60 cm) montées en série, élué dans un tampon contenant 0,1 M d'acétate d'ammonium, débit : 1ml/min.

La fraction **PSA-UI** extraite par le procédé SEPROSYS® possède un poids moléculaire moyen de 61 kDa mais montre une polydispersité importante. Le poids moléculaire moyen de la fraction **PSA-UR (56 kDa)** est proche de celui obtenu pour la fraction **PSA-UI (61 kDa)**. Le profil HPL-SEC montre trois populations polysaccharidiques représentées par trois pics élués à 10,6 minutes (> 300 kDa), 14,8 minutes (112 kDa) et 18,3 minutes (12 kDa). Ces trois pics majoritaires disparaissent au cours de la dépolymérisation. En effet, les populations polysaccharidiques se décalent vers la droite du chromatogramme et vont être éluée à 19,3 minutes. Ce pic augmente au cours de la dépolymérisation et représente une population d'oligosaccharide de bas poids moléculaire. En effet, à t_{24h} le poids moléculaire moyen est de 3280 Da.

Afin d'obtenir une fraction contenant des oligosaccharides de bas poids moléculaire, le temps de dépolymérisation t_{24h} semble adéquat avec un poids moléculaire moyen en-deçà de 10 kDa. Cette fraction appelé **PSB-UI** a ensuite été lyophilisée. Par la suite, la composition biochimique et la caractérisation structurale des fractions **PSB-UI** et **PSB-UR** a été déterminée et comparée aux fractions natives (**PSA-UI** et **PSA-UR**). Les résultats sont donnés dans le *tableau 20*.

Les fractions **PSA-UI** et **PSA-UR** possèdent des caractéristiques structurales différentes avec une population polysaccharidique ayant un PM moyen plus important dans la fraction **PSA-UI** (112 kDa contre 56 kDa). Ces résultats sont concordant avec la littérature. En effet, les travaux de Paesura et al. 2015 montre une population polysaccharidique chez *Ulva intestinalis* de 110 kDa.

*Tableau 20 : Composition biochimique et caractérisation structurale des fractions polysaccharidiques, avant (PSA), et après dépolymérisation (PSB), issues d'Ulva rigida et Ulva intestinalis. Mn (Daltons) = $\sum Ni * Mi/Ni$. Mw (Daltons) = $\sum Ni * Mi^2/\sum Ni$ * Mi. I = indice de polydispersité*

Fraction	Teneurs massiques (%)						Caractérisation structurale		
	Protéine	Sucres totaux	Acides uroniques	Polyphénols	Lipides	Equivalent Sulfates	Mw	Mn	I
PSA-UI	11 ± 2%	74 ± 4%	10 ± 4%	< 1 %	< 1 %	22 ± 3%	112489 Da	47297 Da	2.4
PSB-UI	7 ± 2%	69 ± 6%	7 ± 5%	< 1%	< 1 %	12 ± 1%	3230 Da	1840 Da	2.8
PSA-UR	8 ± 4%	80 ± 5%	6 ± 2%	< 1 %	< 1 %	13 ± 2%	56711 Da	31323 Da	1.8
PSB-UR	1 ± 2%	72 ± 4%	6 ± 3%	< 1%	< 1 %	8 ± 2%	4137 Da	1470 Da	2.8

La fraction **PSA-UI** possède 74 % de polysaccharides totaux dont 10% d'acides uroniques contre 80 % dont 6 % d'acides uroniques pour la fraction **PSA-UR**. La teneur en esters de sulfates portés par les polysaccharides est plus importante dans la fraction **PSA-UI** avec un taux de sulfate de 22 % contre 13 % pour **PSA-UR**. En ce qui concerne la teneur en protéines, les fractions **PSA-UI** et **PSA-UR** en possèdent une faible quantité avec respectivement 11 et 8%. Les teneurs en polyphénols et en lipides sont inférieures à 1% pour les deux fractions. En revanche, concernant les fractions dépolymérisées **PSB-UI** et **PSB-UR**, peu de modifications de la teneur en sucres totaux, en acides uroniques et en protéines sont

visibles. Les fractions sont majoritairement composées de polysaccharides, 69 % pour **PSB-UI** et 72 % pour **PSB-UR**. La dépolymérisation semble avoir impacté la teneur en sulfate pour les fractions provenant d'*Ulva intestinalis* passant de 22% à 12 %, mais peu concernant les fractions issues d'*Ulva rigida*.

Ces résultats obtenus lors de ces travaux sont résumés ci-dessous (*figure 81*) et sont intéressants pour l'entreprise SEPROSYS. Ils permettent en effet d'envisager la valorisation de quatre nouvelles fractions **PROT2-UI**, **PROT2-UR**, **PSB-UI** et **PSB-UR**.

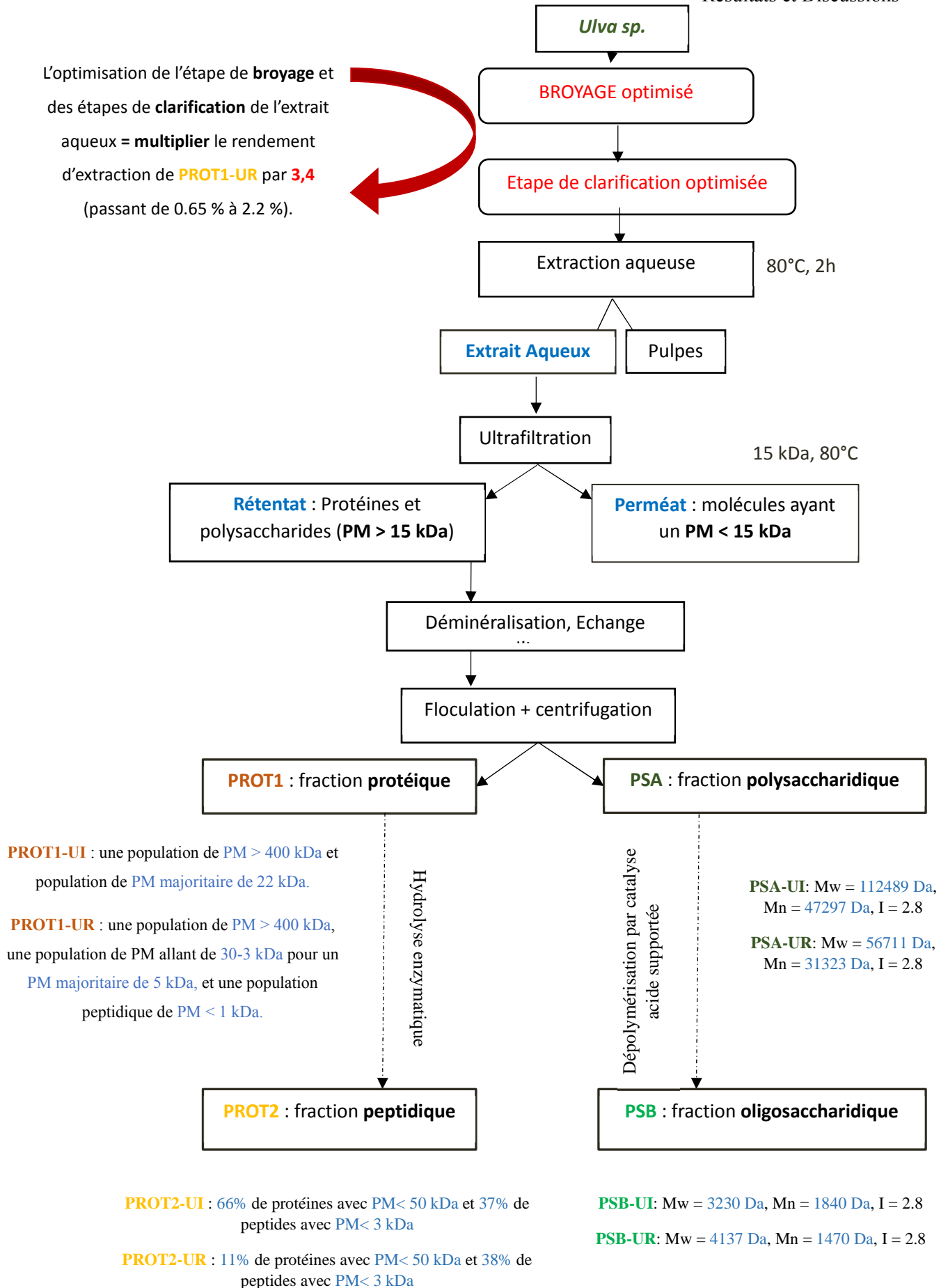


Figure 81 : Schéma récapitulatif de la production des différentes fractions SEPROSYS

4.2 Fractions provenant de macroalgues vertes, remède anti-âge et anti-tâche

Notre peau est le reflet de notre santé et fait l'objet d'attentions particulières de plus en plus grandes. Les signes de l'âge et les imperfections cutanées sont traités au même titre que les dysfonctionnements des autres organes du corps humain. Récemment, les consommateurs ont commencé à se méfier des produits chimiques dans les produits cosmétiques ce qui entraîne une demande croissante de produits naturels et écologiquement durables (ressources vertes et disponibles sans impacter la biodiversité). Ce secteur particulier est constamment à la recherche d'innovations, notamment de principes actifs. À partir de ce point de vue, le monde marin est susceptible d'ouvrir de nombreuses possibilités. Bien que de nombreuses algues aient déjà été utilisées dans certaines formulations cosmétiques, le potentiel des macroalgues marines vertes reste largement inexploité. C'est dans ce contexte que s'inscrit une partie de ce projet de thèse, qui vise à la détermination des potentiels anti-âge et anti-tâche des différentes fractions obtenues à partir du procédé de fractionnement Seprosys appliqué aux algues *U. intestinalis* et *U. rigida*.

Dans une première partie, nous identifierons le potentiel anti-âge des différentes fractions produites par le procédé SEPROSYS. Le vieillissement de la peau est étroitement lié à la dégradation de la matrice extracellulaire, et donc à la réduction de la production de ses composants tels que **le collagène** ou **l'acide hyaluronique**, mais aussi à la combinaison, en outre, de l'augmentation du niveau d'**activité de la MMP-1**. Nous évaluerons l'impact de nos fractions sur la viabilité de fibroblastes dermiques humains, sur la production de collagène et d'acide hyaluronique et sur l'activité de la MMP-1.

Dans la seconde partie de ces travaux, nous identifierons le potentiel anti-tâche des différentes fractions SEPROSYS. Les tâches pigmentaires retrouvées sur la peau sont causées, principalement, par l'accumulation de mélanine produite par les mélanocytes, dans des organites appelés mélanosomes. La quantité de mélanine produite par les mélanocytes est principalement déterminée par la régulation directe ou indirecte de la tyrosinase, enzyme responsable des premières étapes de la voie de synthèse de la mélanine. Nous évaluerons donc l'impact des différentes fractions sur la viabilité de mélanocytes murins, la production et la sécrétion de mélanine et sur l'activité de la tyrosinase.

Afin d'évaluer *in vitro* les potentiels anti-âge et anti-tâche des différentes fractions provenant d'*U. intestinalis* et *U. rigida*, nous utiliserons deux lignées fibroblastiques dermiques humaines (CCD 1059, provenant d'une femme caucasienne de 20 ans et CCD 1090, provenant d'une femme caucasienne de 46 ans), et une lignée de mélanocytes murins B16F0, très utilisée en dermocosmétique pour le criblage d'actifs anti-tâche.

4.2.1 Détermination du potentiel anti-âge des fractions algales

Le potentiel anti-âge des fractions issues d'*U. rigida* et *U. intestinalis* correspondant à l'extrait aqueux (**EA-UI** / **EA-UR**), au rétentat (**R-UI** / **R-UR**), au perméat (**P-UI** / **P-UR**) à la fraction protéique (**PROT1-UI** / **PROT1-UR**) et à la fraction polysaccharidique (**PSA-UI** / **PSA-UR**), a été évalué sur deux lignées fibroblastiques dermiques humaines (CCD 1059, provenant d'une femme caucasienne de 20 ans et CCD 1090, provenant d'une femme caucasienne de 46 ans) à des concentrations allant de 10 à 500 µg/ml (concentration limite pour la rentabilité du produit). Ces concentrations ont été choisies afin de rester dans la linéarité du premier projet de thèse (Adrien. 2016).

a. Cytotoxicité des fractions algales

i. Effet des fractions algales sur la viabilité cellulaire des fibroblastes

Les *figures 82.A et 82.B* présentent l'effet de ces fractions sur la viabilité des deux lignées fibroblastiques 1059 et 1090. En ce qui concerne **la lignée 1059**, nous observons que l'ensemble des fractions induit une diminution significative dose-dépendante de la viabilité cellulaire significative, exceptées **P-UI** et **P-UR** qui semblent peu l'affecter. A la concentration la plus élevée (500 µg/ml), la viabilité cellulaire est la plus diminuée, de 72 et 65% pour **EA-UI** et **EA-UR**, de 32 et 59 % pour **R-UI** et **R-UR**, et de 42 et 47% pour **PROT1-UI** et **PROT1-UR**. Les fractions contenant des biomolécules de hauts poids moléculaires semblent donc avoir un impact plutôt négatif sur la viabilité cellulaire des fibroblastes **1059** alors que les fractions contenant des biomolécules de bas poids moléculaires, telles que **P-UI** et **P-UR**, ont peu d'impact sur la croissance fibroblastique. Pour **la lignée 1090**, nous pouvons observer des résultats très similaires, hormis pour les fractions **R-UR** et **PROT1-UR** qui, contrairement à la lignée **1059**, n'affectent pas la viabilité cellulaire. Malgré, cette diminution de viabilité cellulaire, aucune différence morphologique n'a pu être observée sur les deux lignées fibroblastiques au contact des différentes fractions. Les fractions modifient donc la croissance des fibroblastes mais n'altèrent pas leur morphologie. Ces observations nous conduisent à penser que les différentes fractions n'induisent pas de nécrose.

Le test MTT utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire permet de dénombrer les cellules dont le métabolisme respiratoire mitochondrial est viable. Il mène donc à une appréciation de la différence du nombre de cellules vivantes dans les puits entre les conditions d'essai et des conditions contrôles. Il ne permet pas d'estimer l'impact d'un composé sur la cytotoxicité en termes de mort cellulaire. Afin de pallier à ce manque d'information, nous avons donc également évalué l'effet des fractions algales sur la mort cellulaire par nécrose des souches

fibroblastiques en culture.

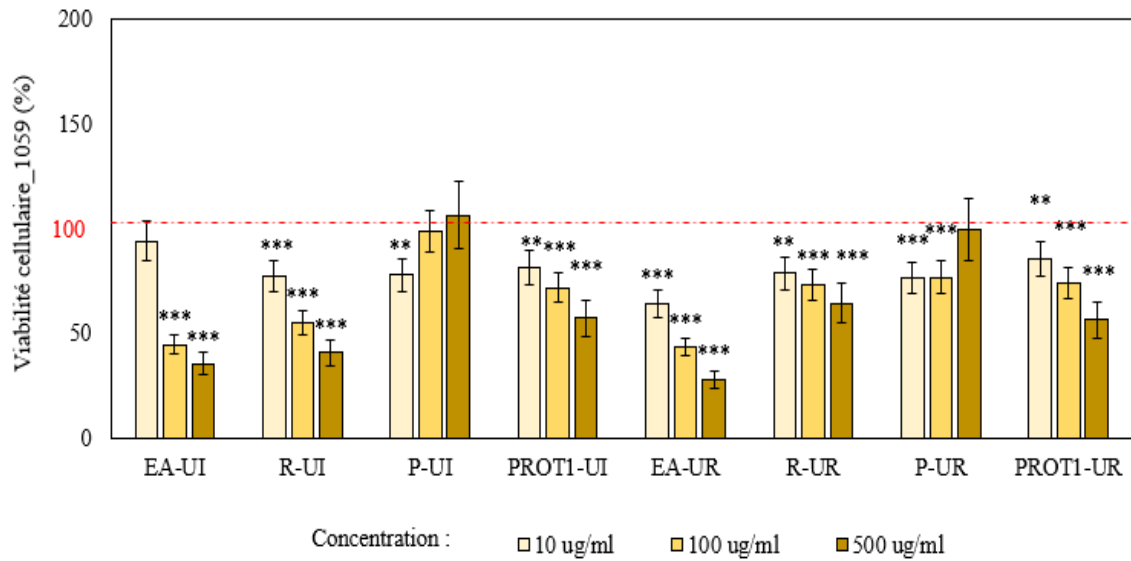


Figure 82.A: Test de viabilité cellulaire sur la lignée fibroblastique 1059 après 48 h de contact avec les différentes fractions issues du procédé Seprosys. La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type avec $n = 10$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$)

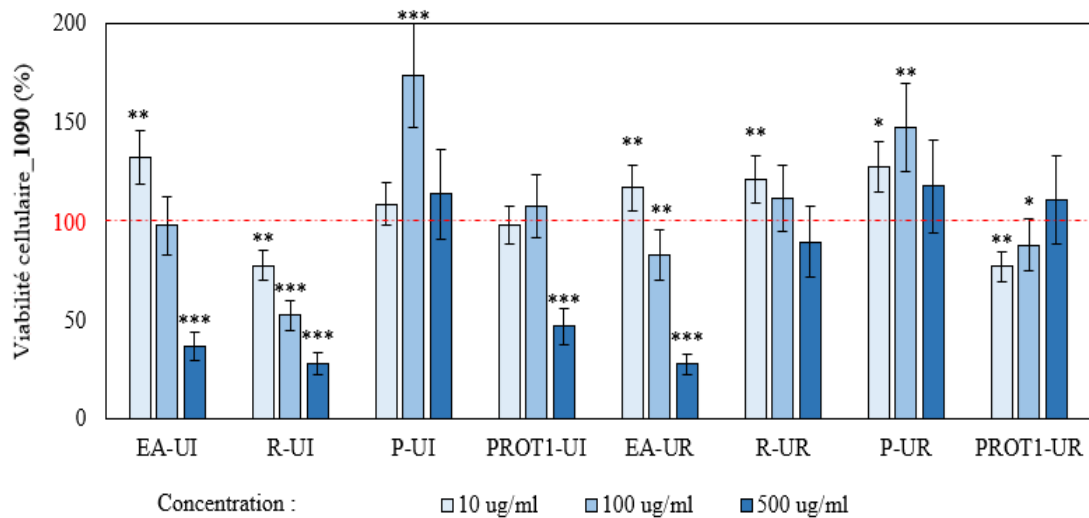


Figure 82.B: Test de viabilité cellulaire sur la lignée fibroblastique 1090 après 48 h de contact avec les différentes fractions issues du procédé Seprosys. La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type avec $n = 10$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$)

ii. Effet des fractions algales sur la mortalité cellulaire des fibroblastes

La mort cellulaire peut être évaluée par la quantification de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) libérée par les cellules nécrosées, qui présentent des lésions de leur membrane plasmique. Cette enzyme cytoplasmique stable présente dans toutes les cellules est en effet rapidement libérée dans le surnageant de culture cellulaire après endommagement de la membrane plasmique. Les figures 83.A et 83.B montrent la mortalité induite par les différentes fractions sur les lignées fibroblastiques.

Concernant la lignée fibroblastique 1059, nous n'observons pas de mortalité significative induite par les différentes fractions à 10 et 100 µg/ml. Seules les fractions **R-UR**, **PROT1-UR**, **R-UI** et **PROT1-UI** semblent montrer une légère cytotoxicité à 500 µg/ml, exprimée par une augmentation de la mortalité cellulaire par nécrose de l'ordre de 10 à 26%. A l'inverse, les fractions **P-UI** et **P-UR** semblent avoir un effet protecteur puisqu'elles réduisent la mortalité cellulaire de 20 et 11%.

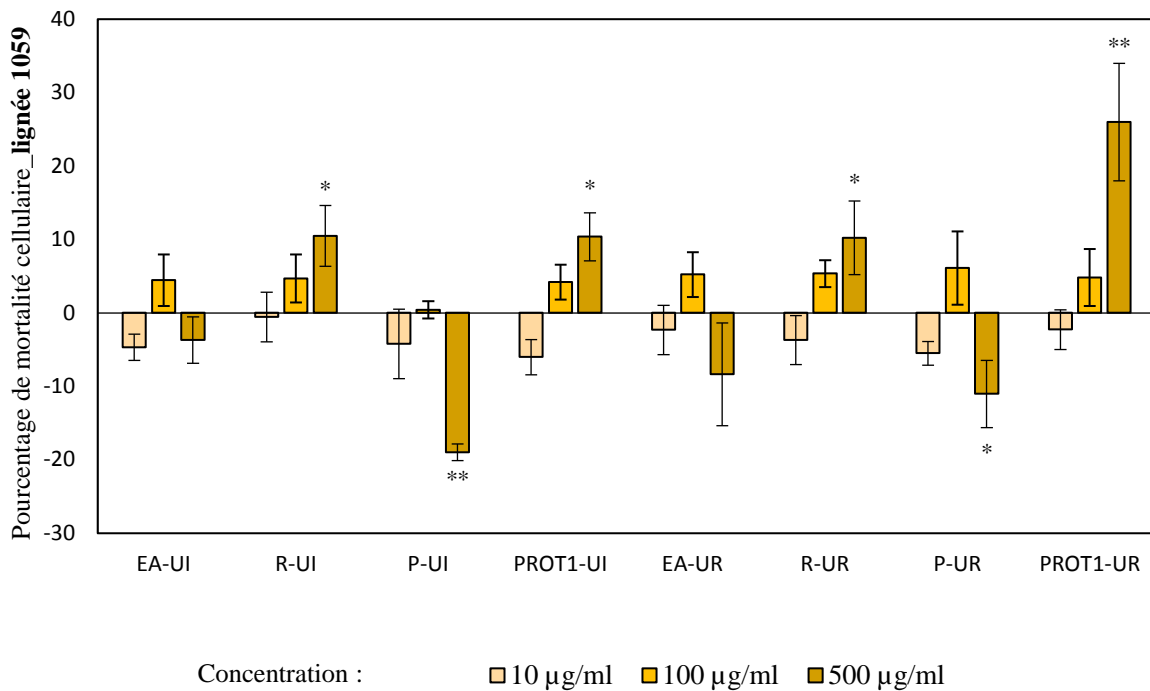


Figure 83.A: Test de mortalité cellulaire sur la lignée fibroblastique 1059 après 48 h de contact avec les différentes fractions issues du procédé Seprosys. La mortalité des cellules a été exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type avec n = 10 répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * (p < 0.05), ** (p < 0.01) and *** (p < 0.001).

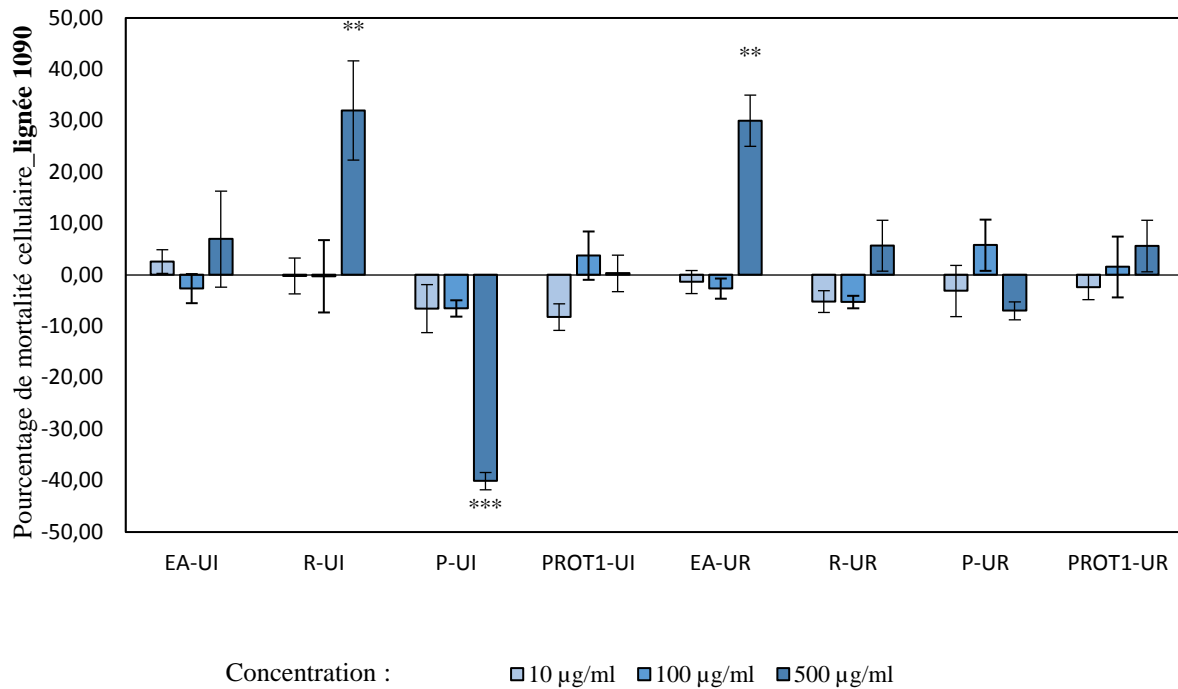


Figure 83.B :Test de mortalité cellulaire sur la **lignée fibroblastique 1090** après 48h de contact avec les différentes fractions issues du procédé Seprosys. La mortalité des cellules a été exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type avec $n = 10$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

Nous pouvons faire la même observation pour la **lignée fibroblastique 1090**, avec néanmoins une augmentation de la mortalité cellulaire par nécrose induite par les fractions **EA-UR** et **R-UI** à forte concentration (respectivement +30 et +32% à 500 µg/ml). A l'inverse, **P-UI** est à l'origine d'une diminution de 40% de la mortalité cellulaire à la même concentration. L'effet protecteur du perméat observé avec la lignée 1059 se confirme donc avec cette lignée 1090.

Quelle que soit la lignée fibroblastique, toutes les fractions excepté le perméat induisent une diminution de viabilité cellulaire, détectée par test MTT, mais aucune mort cellulaire par nécrose, démontrée par test LDH (hormis à haute concentration pour les fractions **EA-UR**, **R-UR**, **PROT1-UR**, **R-UI** et **PROT1-UI**) laissant entendre que la diminution de leur viabilité cellulaire observée est due à un effet cytostatique. Aucune altération morphologique caractéristique des fibroblastes n'ayant été observée, l'éventualité d'un effet pro-apoptotique non nécrotique, indétectable via le test LDH, est écartée. Il serait nécessaire toutefois pour le prouver sans ambiguïté de réaliser une analyse d'effet pro-apoptotique directe mais ce test très lourd n'a pu être réalisé faute de temps. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Kmail et *al.* (2015) avec des macrophages hépatiques. Au contact d'extraits d'*Asparagus aphyllus*, de *Crataegus aronia* et d'*Ephedra alata*, la viabilité cellulaire diminue rapidement sans aucune modification significative de la mortalité cellulaire par nécrose. Des résultats similaires ont été mis en évidence également chez des mélanocytes traités à l'acide férulique (Yoon et *al.* 2015). Autre fait notable, les fractions **P-UR** et **P-UI** contiennent des biomolécules ayant un poids moléculaire inférieur à 15 kDa, comme expliqué dans la partie 4.1.1 et semblent

avoir un rôle protecteur, en diminuant la mortalité cellulaire par rapport aux cellules contrôles, mettant en lumière l'importance du poids moléculaire sur l'impact des différentes fractions.

b. Effet pro-collagène des fractions algales sur les lignées fibroblastiques 1059 et 1090

i. Production de collagène intra-cellulaire

L'activité pro-collagène des fractions issues d'*U. rigida* et *U. intestinalis* a été évaluée en utilisant l'acide hyaluronique (AH) comme témoin positif (figures 84.A et 84.B). Il est en effet utilisé dans de nombreuses compositions de crèmes anti-âge car il est reconnu par les récepteurs CD44 à la surface des fibroblastes, ce qui active les voies de signalisation impliquées dans leur prolifération et l'augmentation de leur production de collagène (Chen et al. 2011; Montanari et al. 2008). Le dosage au Sirius Red employé lors de cette étude permet d'estimer la teneur en collagène sans faire de distinction entre les différents types de collagène et permet de doser le collagène intracellulaire et lié à la membrane plasmique. Dans ces conditions d'études, l'AH a induit comme attendu une augmentation de la production de collagène par cellule de 79% pour la lignée cellulaire 1059 et de 78% pour la lignée cellulaire 1090. Afin d'éviter toute interférence, différents témoins négatifs (de nature protéique et polysaccharidiques et de poids moléculaires divers) ont été testés pour s'assurer de la spécificité du dosage. Les résultats n'ont montré aucune augmentation significative de la production de collagène mettant en évidence la spécificité du dosage (données non présentées).

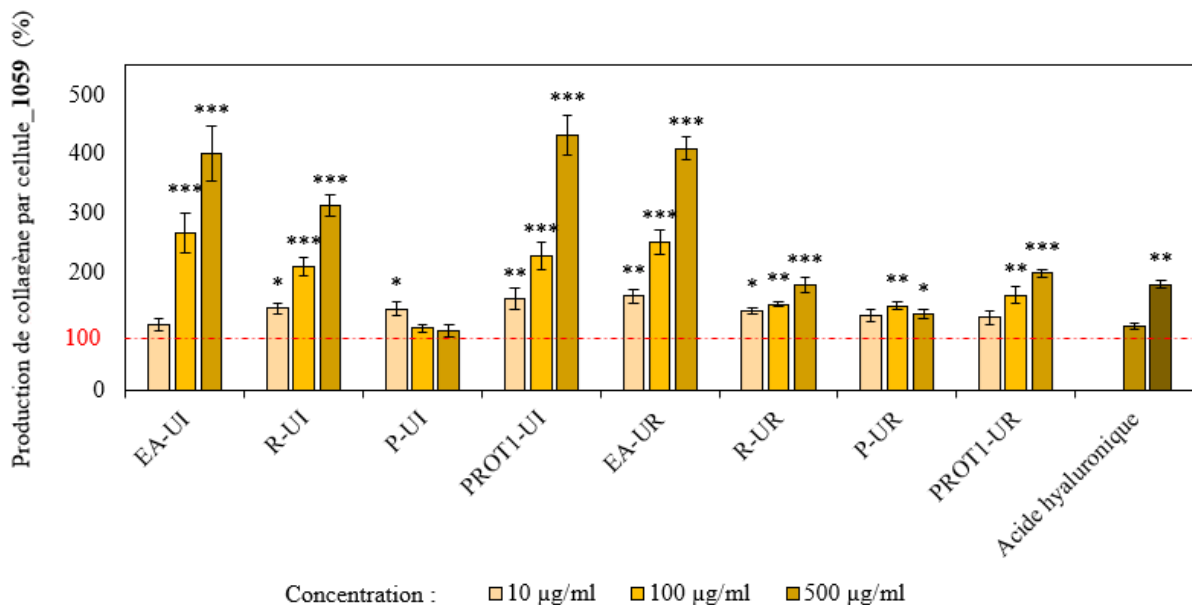


Figure 84.A: Production de collagène par cellule (lignée fibroblastique 1059) après 48 h de contact avec les différentes fractions issues du procédé Seprosys. La quantité de collagène produit par cellule a été exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type avec $n = 10$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

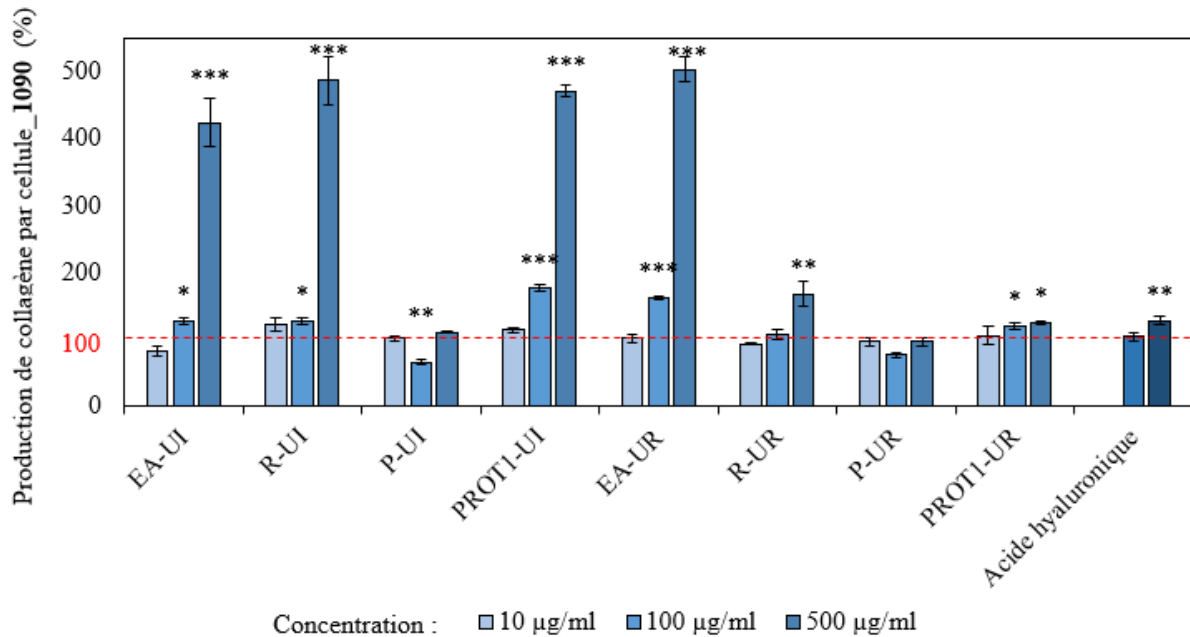


Figure 84.B : Production de collagène par cellule (lignée fibroblastique 1090) après 48 h de contact avec les différentes fractions issues du procédé Seprosys. La quantité de collagène produit par cellule a été exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type, avec $n = 10$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

Les fractions **EA-UI**, **R-UI** et **PROT1-UI** sont très actives et induisent à 500 $\mu\text{g/ml}$ respectivement 300%, 212% et 330% d'augmentation de la production de collagène par cellule de la **lignée 1059**. L'effet pro-collagène de ces fractions sur la **lignée cellulaire 1090** est très similaire mais encore plus significatif, atteignant entre 325 et 370 % d'augmentation de production à la même concentration. Les fractions provenant de l'extraction d'*U. rigida* présentent en revanche des résultats assez différents. Hormis la fraction **EA-UR** qui stimule fortement la production de collagène par cellule (+ 309% pour la lignée 1059 et + 403 % pour la lignée 1090 à 500 $\mu\text{g/ml}$), les autres fractions sont beaucoup moins actives, induisant une augmentation de l'ordre de 25 à 100 % pour les deux lignées cellulaires.

Enfin, les fractions **P-UI** et **P-UR** ne montrent pas d'activité pro-collagène significative sur les deux lignées fibroblastiques, ce qui indique que les composés responsables de cette activité sont des biomolécules de poids moléculaire supérieur à 15 kDa et semblent être concentrées dans les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR**, l'effet étant nettement plus marqué pour la fraction **PROT1-UI**. La fraction polysaccharidique **PSA-UR** n'ayant pas présenté d'activité pro-collagène vis-à-vis de la lignée 1059 (évaluée lors de travaux antérieurs visant à la valoriser (Adrien. 2016; Adrien et al. 2017)), et une activité très faible vis-à-vis de la lignée 1090 (de l'ordre de + 20 à + 50% d'augmentation sur les mêmes concentrations ; données non présentées), la nature protéique, ou peptidique (car les conditions d'obtention de la fraction **PROT1** sont relativement propice à l'hydrolyse, température élevée et milieu acide), des molécules actives extraites des deux algues semble la plus probable, confirmant les résultats préliminaires obtenus lors de la thèse précédente. Le fait que la fraction **PROT1-UI** issue d'*U. intestinalis* soit beaucoup plus active que la fraction **PROT1-UR** issue d'*U. rigida* peut être dû

à leur différence en termes de composition ou de nature de protéines ou/et peptides comme démontrés dans la partie 4.1.3. En effet, les fractions **PROT1-UR** et **PROT1-UI** possèdent des populations protéiques présentes en proportions différentes. La population protéique majoritaire dans la fraction **PROT1-UI** possède un poids moléculaire situé entre 50 et 10 kDa (85%) alors que la fraction **PROT1-UR** possède en majorité une population protéique ayant un PM > 50 kDa (85%) et peu de protéines ayant un PM situé entre 50 et 10 kDa (6 %) (p.128/129). Il se peut que la population protéique responsable de l'activité ait un PM situé dans cet intervalle de tailles, expliquant une activité plus marquée pour la fraction **PROT1-UI**.

L'activité pro-collagène est confirmée pour les fractions **EA-UR**, **R-UR**, **PROT1-UR**, **EA-UI**, **R-UI** et **PROT1-UI** sur deux lignées fibroblastiques indépendantes, appuyant donc l'activité pro-collagène sans ambiguïté. Les résultats tendent à indiquer que les conditions physiologiques de départ des cellules liées à l'âge de la peau ont peu d'effets sur l'impact des fractions puisque les deux lignées fibroblastiques diffèrent par l'âge des donneuses (20 ans pour la lignée 1059 et 46 ans pour la lignée 1090). Néanmoins il existe des différences physiologiques entre ces deux lignées. Une étude a par exemple montré que les fibroblastes de sujets âgés de 18 à 29 ans synthétisaient une quantité de procollagène de type I égale à 82 ng pour 50 000 cellules, alors que les cellules de sujets âgés de 80 ans et plus synthétisaient une quantité de procollagène de type I égale à 56 ng pour 50 000 cellules dans des conditions identiques (Montanari et al. 2008).

L'activité anti-âge a déjà été démontrée chez des extraits algaux comme par exemple, AOSAINÉ[®], induisant une augmentation de la synthèse de collagène. AOSAINÉ[®] est particulièrement intéressant car il est composé d'un extrait protéique d'*Ulva lactuca* (BiotechMarine, SEPPIC). De plus, il a été rapporté qu'un tripeptide Lysine-valine-Lysine associé à un extrait d'*Ulva lactuca* stimulait la synthèse de collagène des fibroblastes humains de 75% (Montanari et al. 2008). Cette séquence peptidique n'est pas retrouvée au sein des peptides énoncés aux pages 131 et 132. En revanche, la valine est présente en grande quantités dans les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** (résultats donnés page 122). La fraction **PROT1-UI** montre une séquence peptidique contenant une valine entouré d'un autre acide aminé hydrophobe, comme la leucine, au temps de rétention 30,47 minutes (TI/LI/LVI/LS). Si l'hydrophobicité des acides aminés joue un rôle dans l'activité pro-collagène, il se peut que cette séquence soit à l'origine d'une partie ou de la totalité de l'activité. Au sein de la fraction **PROT1-UR**, une séquence contient, elle aussi, une valine entouré d'acide aminé hydrophobe (**LVL** à 25,21 minutes de rétention). De plus, un peptide identifié à 30,41 minutes de rétention est composé de lysine et de valine. On pourrait penser qu'en fonction de la configuration 3D de la protéine, le résidu valine pourrait être entouré spatialement de deux lysines.

Un peptide (D-P-K-G-K-Q-Q-A-I-H-V-A-P-S-F) de *Pyropia yezoensis* est capable d'activer la voie de signalisation TGF- β / Smad, qui augmente la synthèse de collagène (Kim et al. 2017). Cette séquence peptidique n'est pas présente dans les peptides issus de l'hydrolyse des protéines composant les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** (résultats donnés page 131/132). Néanmoins, les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** sont susceptibles de contenir des peptides ayant des séquences communes et des tailles similaires aux exemples précédents.

ii. Inhibition de la MMP-1

Comme exposé précédemment dans l'étude bibliographique (p.58), de nombreux extraits algaux décrit précédemment ont montré une activité inhibitrice d'une collagénase interstitielle appelée « matrix métalloprotéase » 1 (MMP-1). La MMP1 est impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Plus précisément, la MMP-1 décompose les collagènes interstitiels de types I, II et III. Afin d'évaluer la capacité des fractions issues d'*U. rigida* et *U. intestinalis* à inhiber l'activité de la MMP-1, nous les avons confrontées à l'inhibiteur de référence qu'est le *piroxicam* (tableau 21).

Tableau 21: Pourcentages d'inhibition de la MMP-1 des différentes fractions provenant d'*U. intestinalis* et d'*U. rigida*, et du *Piroxicam* à 100 µg/ml.

Fraction issue d' <i>U. intestinalis</i>	Pourcentage d'inhibition à [100 µg/ml]	Fraction issue d' <i>U. rigida</i>	Pourcentage d'inhibition à [100 µg/ml]
EA-UI	3 ± 4 %	EA-UR	0 ± 6 %
R-UI	16 ± 3 % *	R-UR	25 ± 7 % *
P-UI	8 ± 4 %	P-UR	22 ± 7 % *
PROT1-UI	-1 ± 2 %	PROT1-UR	7.5 ± 2 %
PSA-UI	4 ± 3 %	PSB-UR	-3 ± 4%
Inhibiteur de référence : Piroxicam		59 ± 6 % à 100 µg/ml	

Les seules fractions montrant une inhibition significative de la MMP-1 sont le rétentat (**R-UR**) et le perméat (**P-UR**) issus d'*U. rigida*, avec respectivement 25 % et 22 % d'inhibition à 100 µg/ml, ainsi que le rétentat issu d'issues d'*U. intestinalis* (**R-UI**) avec 16 % d'inhibition à 100 µg/ml. Cette inhibition reste modérée en comparaison de l'inhibition induite par le Piroxicam mais elle est pour autant non négligeable étant donné que les fractions actives sont constituées d'un mélange de nombreux composés, à la différence du Piroxicam, molécule pure.

Il est difficile, ici, d'appréhender quel type de biomolécule est à l'origine de cette activité inhibitrice. Dans la littérature, il est rapporté l'effet inhibiteur d'une fraction de polysaccharides sulfatés appelé fucoïdanes de 16 kDa provenant de macroalgues brunes, sur la MMP-1 (Senni et al. 2006). De plus, il a été démontré que des ulvanes provenant d'*Ulva lactuca* inhibent l'activité de la MMP1 permettant une augmentation de la concentration en collagène (Pereira 2018). Il se peut que des polysaccharides sulfatés omniprésents dans les fractions **R-UI** (64%), **R-UR** (90%) et **P-UR** (26%) leur conférant l'activité inhibitrice de la MMP-1. Néanmoins, les fractions **PSA-UI** et **PSA-UR** ne montrent pas d'activité inhibitrice de la MMP-1. Cela pourrait s'expliquer par la dégradation des polysaccharides au cours du procédé, diminuant le poids moléculaire de ces polysaccharides.

c. Effet pro-acide hyaluronique des fractions algales sur les lignées fibroblastiques 1059 et 1090

L'activité pro-hyaluronique des fractions issues d'*U. rigida* et *U. intestinalis* a été évaluée en utilisant le TGF- β comme témoin positif (*figures 85.A et 85.B*). Il est en effet connu pour stimuler la production d'acide hyaluronique par les fibroblastes dermiques (Tanimoto et al. 2004). La production d'acide hyaluronique par les lignées cellulaires fibroblastiques 1059 et 1090 a été étudiée au moyen d'un dosage de type ELISA permettant d'estimer la teneur en acide hyaluronique extracellulaire présent dans les surnageants cellulaires. Dans ces conditions d'études, le TGF- β a induit une augmentation de la production d'acide hyaluronique par cellule de 44% pour la lignée cellulaire 1059 et de 30% pour la lignée cellulaire 1090 à 10 $\mu\text{g/ml}$. On note ainsi une légère différence de réponse entre les deux lignées cellulaires. La lignée fibroblastique 1059, peau jeune de 20 ans, semble réagir plus fortement au TGF- β pouvant s'expliquer par un métabolisme plus réactif que la lignée fibroblastique 1090 représentant un peau plus mature. En effet, il existe des différences métabolique entre de jeunes fibroblastes et des fibroblastes plus âgés, les jeunes fibroblastes proliférant plus rapidement et montrant une activité enzymatique plus importante (Remacle et al. 1980).

Compte-tenu du fait que le dosage ELISA utilisé implique l'intervention d'une protéine de liaison à l'acide hyaluronique et non d'un anticorps monoclonal, différents témoins négatifs, de natures protéique ou polysaccharidique et de poids moléculaires diverses ont également été testés. Les résultats n'ont montré aucune augmentation significative de la production d'acide hyaluronique dans ces conditions témoins, confirmant la spécificité du dosage ELISA vis-à-vis de l'acide hyaluronique (données non présentées). Les différentes fractions ont été testées à seulement deux concentrations (100 et 500 $\mu\text{g/ml}$) par soucis d'économie de puits sur la plaque ELISA. Les fractions **EA-UI**, **R-UI** et **PROT1-UI** induisent, à 500 $\mu\text{g/ml}$, respectivement 177%, 579% et 149% d'augmentation de la production d'acide hyaluronique extracellulaire par cellule de la **lignée 1059**. L'activité pro-hyaluronique de ces fractions sur la **lignée cellulaire 1090** est similaire atteignant, entre 173%, 569% et 292 % d'augmentation de production à la même concentration.

Concernant les fractions provenant de l'extraction d'*U. rigida*, elles présentent des résultats similaires pour la fraction **EA-UR** mais des effets nettement moins marqués pour la fraction **R-UR** induisant une augmentation de l'ordre de 35 % à 44 % pour les deux lignées cellulaires. De plus, la fraction **PROT1-UR** présente une activité pro-hyaluronique seulement pour la **lignée cellulaire 1059**, induisant une augmentation de 252 % de la production d'acide hyaluronique. Les fractions **P-UI** et **P-UR** ne montrent pas d'activité pro-hyaluronique significative pour la **lignée cellulaire 1059** et seulement une augmentation entre 23 et 25 % pour la **lignée cellulaire 1090** respectivement 100 et 500 $\mu\text{g/mL}$. Ces résultats indiquent que les composés responsables de cette activité sont principalement des biomolécules de poids moléculaire supérieur à 15 kDa et semblent être concentrés dans les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR**. La fraction polysaccharidique **PSA-UR** présente une légère activité pro-hyaluronique (+35%) vis-à-vis de la **lignée cellulaire 1059** (évaluée lors de travaux antérieurs visant à la valoriser (Adrien. 2016; Adrien et al. 2017)). Ces résultats laissent penser que la

nature protéique ou peptidique des molécules actives est la plus probable. Une fois de plus, comme pour l'activité pro-collagène, le fait que la fraction **PROT1-UI** soit beaucoup plus active que la fraction **PROT1-UR** peut être dû à leur différence en termes de composition ou de nature de protéines ou/et peptides. En effet, lors des analyses structurales (p.122), des différences de nature protéique et de composition en acides aminés composant les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** ont été mises en évidence.

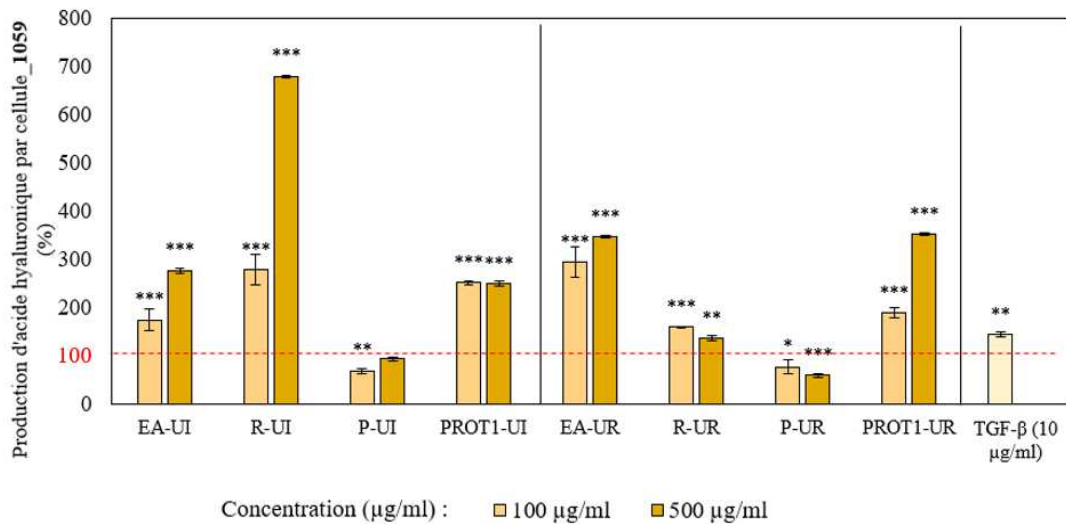


Figure 85.A : Production d'acide hyaluronique par cellule (lignée fibroblastique 1059) après 48 h de contact avec les différentes fractions issues du procédé Seprosys. La quantité d'acide hyaluronique produit par cellule a été exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type avec $n = 10$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

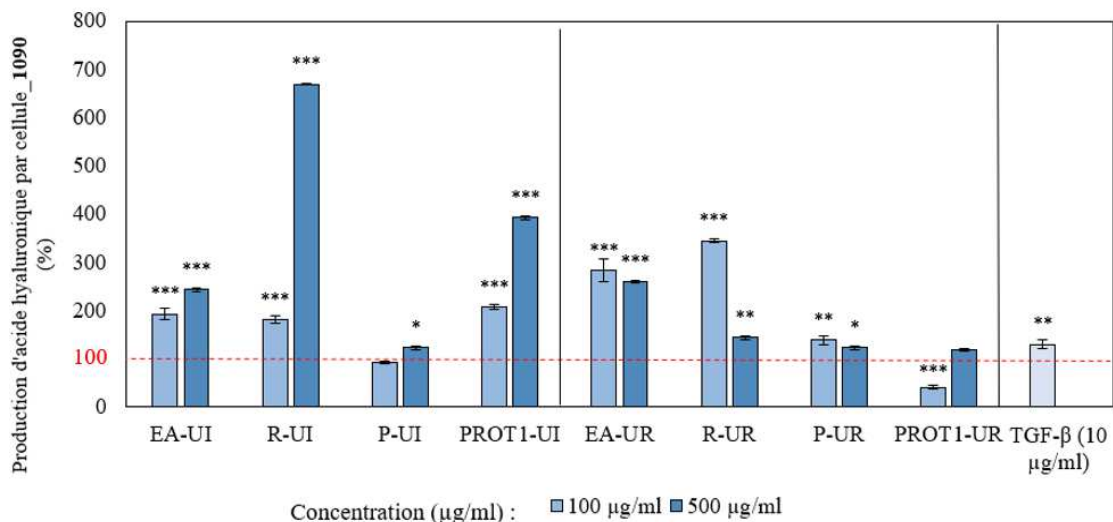


Figure 85.B : Production d'acide hyaluronique par cellule (lignée fibroblastique 1090) après 48 h de contact avec les différentes fractions issues du procédé Seprosys. La quantité d'acide hyaluronique produit par cellule a été exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type avec $n = 10$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

Enfin, comme le TGF- β semble augmenter la production d'acide hyaluronique principalement en stimulant la croissance cellulaire, l'activité des fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** diffère. Le fait que ces fractions favorisent fortement la production d'acide hyaluronique par cellule suggère qu'elles sont capables d'induire la biosynthèse d'acide hyaluronique par les fibroblastes plutôt que leur croissance. Fayad *et al.* (2017) ont montré qu'un extrait aqueux de *Padina pavonica*, macroalgue brune, inhibe la hyaluronidase. Les fractions **PROT1**, également issues d'une extraction aqueuse, pourraient inhiber la hyaluronidase, augmentant la concentration d'acide hyaluronique extracellulaire. Honma *et al.* (2006) ont montré qu'une séquence peptidique particulière (Leu-Glu-His-Ala ou Leu-Asp-His-Ala ou Leu-Glu-His-Ala-Phe) induit la production d'acide hyaluronique. Cette séquence peptidique n'a pas été retrouvée dans les peptides issus de l'hydrolyse des protéines composant les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** (p.131/132), mais il se peut qu'une autre séquence soit à l'origine de l'activité pro-acide hyaluronique. Plus particulièrement, dans la fraction **PROT1-UI** possédant des protéines ayant un poids moléculaire situé entre 50 et 10 kDa (85%) alors que la fraction **PROT1-UR** possède en majorité une population protéique ayant un PM > 50 kDa (85%) et peu de protéine ayant un PM situé entre 50 et 10 kDa (6 %) (p.128/129). Il se peut, comme pour l'activité pro-collagène, que la population protéique responsable de l'activité soit située dans ces intervalles de valeurs expliquant une activité plus marquée pour la fraction **PROT1-UI**.

4.2.2 Mise en évidence du rôle des protéines dans l'activité anti-âge

Dans le but d'évaluer l'implication des protéines dans l'activité pro-collagène et pro-acide hyaluronique, les protéines présentes dans les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** ont été hydrolysées durant 24 h à l'aide du cocktail de protéases Flavourzyme®. Les hydrolysats obtenus ont été nommés **H-PROT1-UI** et **H-PROT1-UR**. Dans un premier temps, la cytotoxicité des fractions **H-PROT1-UI** et **H-PROT1-UR** a été évaluée et dans un second temps, le potentiel pro-collagène et pro-acide hyaluronique de ces fractions a été identifié.

a. Cytotoxicité des fractions hydrolysées **H-PROT1-UI** et **H-PROT1-UR**

i. Effet des fractions algales sur la viabilité cellulaire des fibroblastes

Les figures 86.A et 86.B présentent l'effet des fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** et de leurs hydrolysats **H-PROT1-UI** et **H-PROT1-UR** sur la viabilité des deux lignées fibroblastiques 1059 et 1090 à la concentration la plus forte, 500 $\mu\text{g/ml}$.

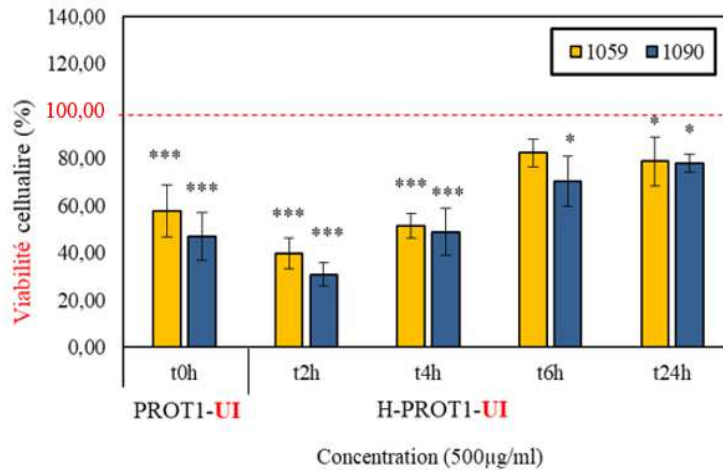


Figure 86.A : Viabilité cellulaire des lignées fibroblastiques 1059 et 1090 après 48 h de de culture en présence des fractions PROT1-UI et H-PROT1-UI. La viabilité des cellules est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type avec $n = 10$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

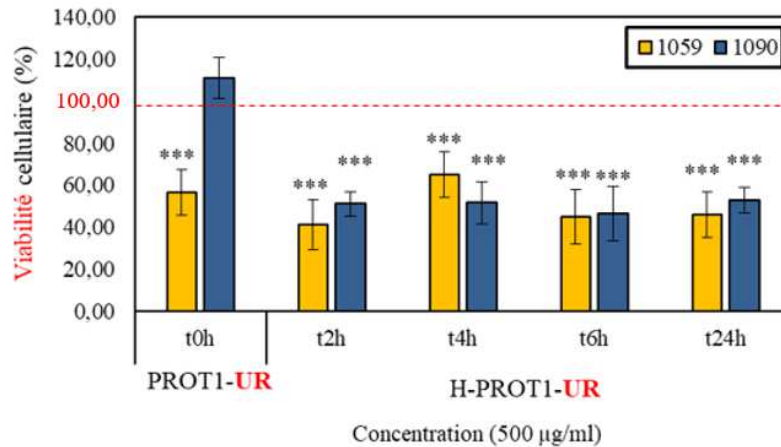


Figure 86.B. Viabilité cellulaire des lignées fibroblastiques 1059 et 1090 après 48 h de culture en présence des fractions PROT1-UR et H-PROT1-UR. La viabilité des cellules est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type avec $n = 10$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

En ce qui concerne **PROT1-UI**, nous observons des résultats similaires entre les deux lignées cellulaires. **PROT1-UI** diminue la prolifération des fibroblastes, réduisant de 42% la prolifération de la lignée cellulaire 1059 et de 49% la prolifération de la lignée 1090 à 500 $\mu\text{g/ml}$. L'effet des fractions **H-PROT1-UI** (**t2h**, **t4h**, **t6h** et **t24h**) sur la prolifération des fibroblastes est plus faible que celui de **PROT1-UI**. En effet, dans les puits traités au **H-PROT-124h**, la viabilité cellulaire atteint 79% pour la lignée cellulaire 1059 et 78% pour la lignée cellulaire 1090. Ces résultats mettent en évidence que la diminution de poids moléculaire conduit à une diminution de l'effet sur la prolifération des fibroblastes. L'hydrolyse des protéines permet de s'affranchir de l'effet sur la viabilité cellulaire. On peut donc supposer de la nature protéique de la biomolécule impactant la viabilité fibroblastique.

Pour la fraction **PROT1-UR**, concernant la lignée cellulaire 1059, l'effet des

hydrolysats **H-PROT1-UR** sur la viabilité cellulaire est très proche de celui de la fraction non hydrolysée, passant de 56% (t0h) à 46% (t24h) à 500 µg/ml. En ce qui concerne la lignée cellulaire 1090, l'hydrolyse de la fraction **PROT1-UR** provoque une diminution de la viabilité cellulaire passant de 111% (t0h) à 52% (t24h) à 500 µg/ml. Le test MTT ne permettant pas d'estimer l'impact des fractions **H-PROT1** en termes de mort cellulaire, nous avons donc également évalué l'effet des fractions hydrolysées sur la mort cellulaire des fibroblastes en culture.

ii. *Effet des fractions algales sur la mortalité cellulaire des fibroblastes*

Les figures 87.A et 87.B montrent la mortalité cellulaire induite par les différentes fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** ainsi que leurs hydrolysats (**H-PROT1-UI** et **H-PROT1-UR**) sur les lignées fibroblastiques à la concentration la plus forte, 500 µg/ml. Concernant les fractions **PROT1-UI** et **H-PROT1-UI**, nous n'observons pas de mortalité significative induite à 500 µg/ml, et ce pour les deux lignées cellulaires. De la même façon, la fraction **PROT1-UR** et ses hydrolysats (**H-PROT1-UR**) ne montrent pas de mortalité significative pour la lignée 1090. En revanche, on remarque des effets notables concernant la lignée cellulaire 1059. En effet, la fraction **PROT1-UR** perd sa cytotoxicité après hydrolyse (**H-PROT1-UR**). Au contraire, les fractions **H-PROT1-UR** présentent un effet protecteur : la mortalité cellulaire diminue en passant de +22% (t0h) à -21% (**H-PROT1-UR**_{t2h}), -19% (**H-PROT1-UR**_{t6h}) et -17% (**H-PROT1-UR**_{t24h}).

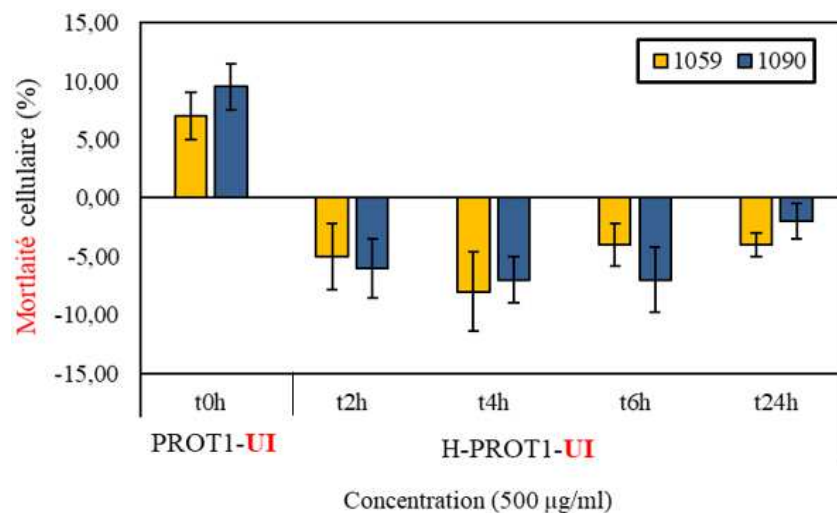


Figure 87.A : Mortalité cellulaire des lignées fibroblastiques 1059 et 1090 après 48 h de culture en présence des fractions **PROT1-UI** et **H-PROT1-UI**. La mortalité cellulaire est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type avec n = 10 répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * (p < 0.05), ** (p < 0.01) and *** (p < 0.001).

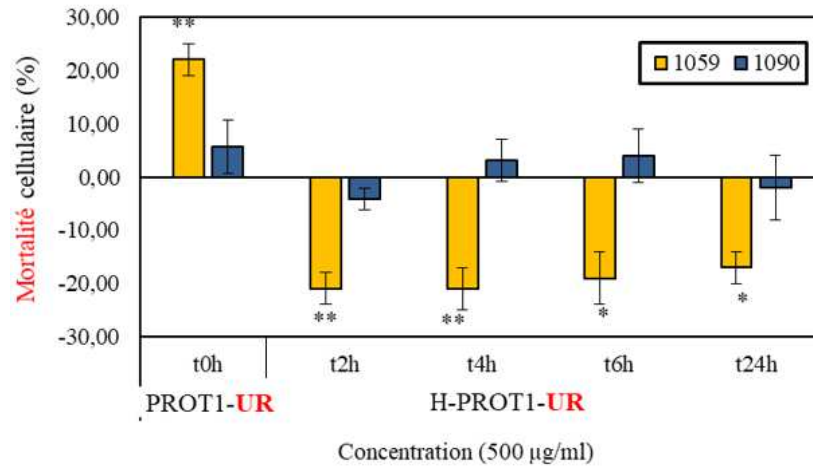


Figure 87.B. Mortalité cellulaire induite par les fractions **PROT1-UR** et **H-PROT1-UR** après 48 h de culture en présence des fractions **PROT1-UR** et **H-PROT1-UR**. La mortalité des cellules est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type avec $n = 10$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

L'hydrolyse de de la fraction **PROT1-UR** provoque une diminution de la masse moléculaire des protéines présentes, libérant des peptides. Les peptides libérés lors de l'hydrolyse peuvent donc être à l'origine de cet effet protecteur, en diminuant la perméabilité membranaire des fibroblastes et donc la mortalité cellulaire. Aucun peptide induisant une diminution de la mortalité fibroblastiques n'est connu mais nous pouvons supposer que certains des peptides décrits (p.131/132) pourraient apporter ce rôle protecteur.

La diminution de la mortalité cellulaire par nécrose atteste de la protection cellulaire induite par les fractions **H-PROT1-UR**. Néanmoins, le trop peu d'élément prouvant cet effet protecteur ne nous permettent pas de l'affirmer. Il faudrait compléter ces résultats avec des analyses permettant de prouver la diminution de la nécrose ou de l'apoptose induite par les lignées fibroblastiques. Ces résultats tendent à montrer l'effet de la masse moléculaire des protéines dans l'impact des fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR**.

b. Effet pro-collagène et pro-acide hyaluronique des fractions hydrolysées

Les activités pro-collagène des fractions hydrolysées issues d'*U. intestinalis* et *U. rigida* ont été évaluées en utilisant le même protocole et les mêmes conditions que pour les autres fractions du procédé Seprosys (figure 88). Le témoin positif, l'AH, a induit, comme attendu, une augmentation de la production de collagène par cellule de 79% pour la lignée cellulaire 1059 et de 78% pour la lignée cellulaire 1090. La fraction **PROT1-UI** est très active et induit respectivement +330% et +370% d'augmentation de la production de collagène par cellule pour les lignées 1059 et 1090 à 500 µg/ml.

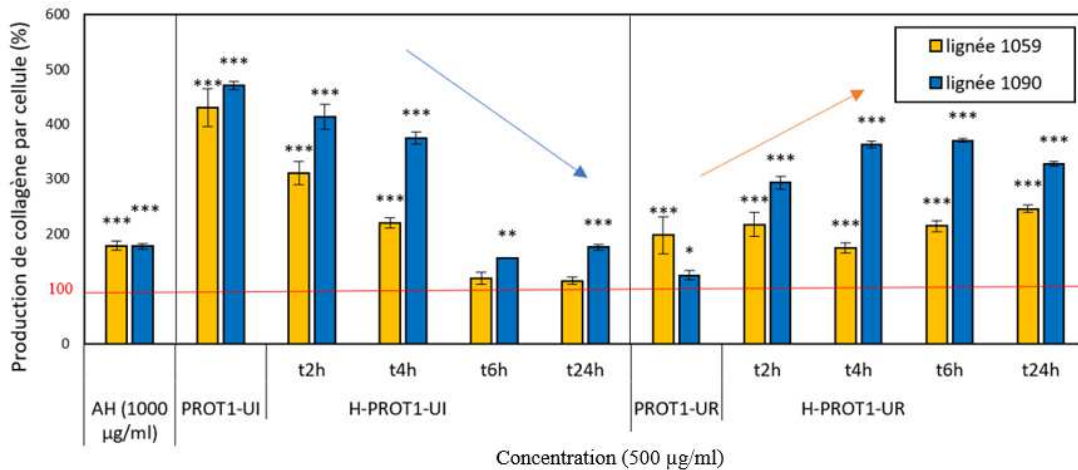


Figure 88 : Production de collagène par cellule (lignées fibroblastiques 1059 et 1090) après 48 h de contact avec les fractions PROT1-UI, H-PROT1-UI, PROT1-UR et H-PROT1-UR issues du procédé Seprosys. La quantité de collagène produit par cellule a été exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type avec $n = 10$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

L'hydrolyse de **PROT1-UI** provoque une diminution nette de la production de collagène au cours de l'hydrolyse et cela, pour les deux lignées cellulaires. On passe de + 330 % pour la fraction **PROT1-UI** à + 19% pour la fraction **H-PROT1-UI_{t6h}** concernant la **lignée cellulaire 1059** et de + 370% (**PROT1-UI**) à + 55 % (**H-PROT1-UI_{t6h}**) concernant la **lignée cellulaire 1090** à 500 µg/ml. Ces résultats attestent d'une relation entre la diminution du poids moléculaire moyen et la diminution de l'activité procollagène. La réponse cellulaire diffère pour la fraction **PROT1-UR** et ses hydrolysats **H-PROT1-UR**. En effet, l'hydrolyse provoque une augmentation de la production de collagène pour la **lignée cellulaire 1090**, passant de + 25% (**PROT1-UR**) à + 270 % (**H-PROT1-UR_{t24h}**) à 500 µg/ml.

L'activité pro-acide hyaluronique des fractions hydrolysées issues d'*U. intestinalis* et *U. rigida* a été évaluée (figure 89). L'hydrolyse enzymatique des fractions **PROT1** provoque une diminution nette de la production d'acide hyaluronique pour les deux lignées cellulaires. On passe de +223 % (**PROT1-UI**) à +12% (**H-PROT1-UI_{t24h}**) pour la **lignée cellulaire 1059** et de +239% (**PROT1-UI**) à +5 % (**H-PROT1-UI_{t24h}**) pour la **lignée cellulaire 1090**.

L'hydrolyse de la fraction **PROT1-UR** génère des résultats similaires pour la **lignée cellulaire 1059** passant de +220 % (**PROT1-UR**) à -20 % (**H-PROT1-UR_{t24h}**) à 500 µg/ml. En ce qui concerne la **lignée cellulaire 1090**, la production d'acide hyaluronique diminue lors de l'hydrolyse passant de +18 % (**PROT1-UR**) à -4% (**H-PROT1-UR_{t24h}**) à 500 µg/ml.

L'hydrolyse des protéines présentes dans la fraction **PROT1-UI** engendre la perte de l'activité pro-acide hyaluronique. Cela veut dire que la diminution du poids moléculaire de ces protéines induit une diminution de l'activité pro-acide hyaluronique.

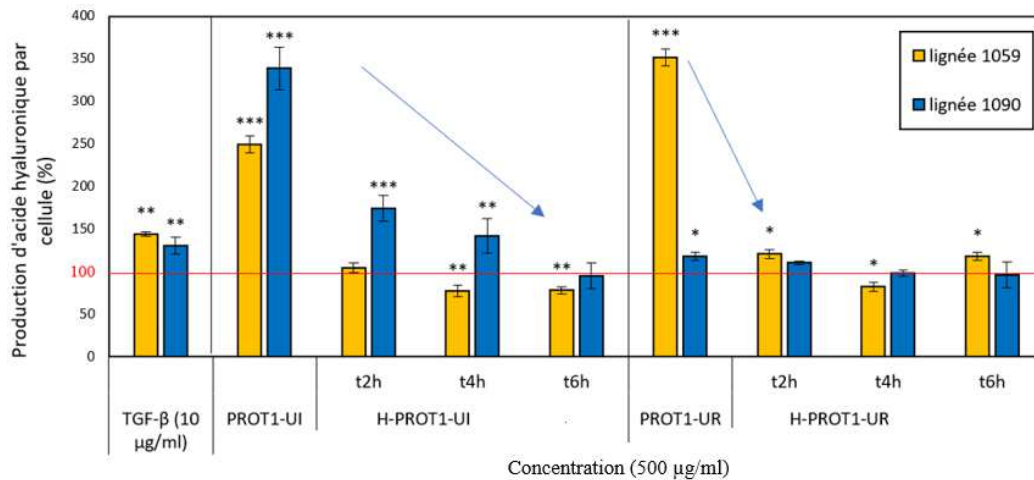


Figure 89 : Production d'acide hyaluronique par cellule (lignées fibroblastiques 1059 et 1090) après 48 h de contact avec les fractions PROT1-UI, H-PROT1-UI, PROT1-UR et H-PROT1-UR. La quantité d'acide hyaluronique produit par cellule est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type avec $n = 10$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

La fraction **PROT1-UR**, elle, possède une activité pro-collagène et pro-acide hyaluronique marquée pour la lignée cellulaire 1059 mais moins significative pour la lignée cellulaire 1090. L'hydrolyse protéique provoque une perte de l'activité pro-acide hyaluronique, mais engendre une augmentation de l'activité procollagène. L'augmentation de l'activité peut être corrélée à l'apparition d'une population protéique ayant un PM compris entre 1 et 15 kDa (détectées par HPL-SEC) et de PM d'environ 27 kDa (détectée par SDS-PAGE), minoritaires dans la fraction **PROT1-UR**. Ces résultats peuvent être corrélés aux résultats de viabilité cellulaire. La diminution de la viabilité fibroblastique peut s'expliquer par une éventuelle réorientation métabolique afin de produire une forte quantité de collagène et d'acide hyaluronique.

Il existe une séquence composée d'arginine-glycine-acide aspartique isolée de l'extraction aqueuse d'*Ulva lactuca*, qui s'est avérée favoriser la production de collagène I en stimulant la prolifération des fibroblastes (Montanari et Guglielmo 2008). De manière similaire, Honma et al. (2006) ont montré qu'une séquence peptidique particulière (Leu-Glu-His-Ala ou Leu-Asp-His-Ala ou Leu-Glu-His-Ala-Phe) induit la production de collagène extracellulaire et d'acide hyaluronique. Ces séquences peptidiques n'ont pas été retrouvées dans les peptides issus de l'hydrolyse de **PROT1-UR** (p.131/132), il se peut que des peptides de nature similaire (hydrophobicité ou charge) aient été libérés lors de l'hydrolyse enzymatique.

L'activité procollagène de la fraction **PROT1-UI** est réduite par l'hydrolyse enzymatique des protéines. Ces résultats mettent en évidence la probable nature protéique de la biomolécule à l'origine de cette activité. Aucune protéine démontrant une activité pro-collagène n'a été rapportée, à ce jour, dans la littérature. Néanmoins, la diminution de l'activité procollagène peut être corrélée à la disparition d'une population protéique majoritaire ayant un poids moléculaire majoritaire de 22 kDa (détectée à la fois par HPL-SEC et SDS-PAGE) et une

population protéique de hauts poids moléculaire, proche de 669 kDa.

Connaissant la composition et la nature protéique de ces deux fractions (**PROT1-UR** et **PROT1-UI**) et de leurs hydrolysats (**H-PROT1-UR** et **H-PROT1-UI**), les hypothèses suivantes peuvent être évoquées :

- La fraction **PROT1-UI** contient une population protéique majoritaire ayant un poids moléculaire majoritaire de 22 kDa (détectée à la fois par HPL-SEC et SDS-PAGE) et une population protéique de haut poids moléculaire (>669 kDa). La diminution des activités pro-collagène et pro-acide hyaluronique observée après hydrolyse pourrait donc être corrélée à la disparition de ces deux populations ou l'une de ces deux populations.
- La fraction **PROT1-UR** contient une population protéique majoritaire de très haut poids moléculaire (>669 kDa), une population protéique ayant un poids moléculaire majoritaire de 15 kDa avec des poids moléculaire allant de 30 à 3 kDa et une population protéique et/ou peptidique ayant un PM < 2 kDa.
Cette fois-ci, la réduction de l'activité pro-acide hyaluronique pourrait être corrélée à la disparition des protéines de PM > 669 kDa et l'augmentation de l'activité pro-collagène attribuée à l'apparition de protéines de PM compris entre 1 et 15 kDa (détectées par HPL-SEC) et de PM d'environ 27 kDa (détectée par SDS-PAGE).

Aucune protéine présentant un poids moléculaire compris entre 1 et 15 kDa n'est connue dans la littérature pour son activité pro-collagène. Il serait intéressant de purifier chaque population protéique afin de confirmer si l'activité pro-collagène est due à la présence d'une population protéique de 22 kDa ou de protéines/polypeptides de plus faibles tailles. De même, concernant l'activité pro-acide hyaluronique, il serait intéressant d'isoler les différentes populations protéiques afin de mettre en évidence l'importance de la population protéique présentant un PM supérieur ou égal à 669 kDa. Dans notre étude, les fractions protéiques purifiées d'*U. intestinalis* (**PROT1-UI**) et d'*U. rigida* (**PROT1-UR**) ont été extraites en utilisant un procédé sans acide ni solvant. Ces fractions permettent d'augmenter la production d'acide hyaluronique et de collagène. Ces activités **pro-collagène** et **pro-acide hyaluronique** ne seraient pas dues à une augmentation du nombre de cellules mais à une activation du métabolisme cellulaire lié à la biosynthèse d'acide hyaluronique et de collagène. Les fractions ont induit une diminution de viabilité cellulaire des deux lignées fibroblastiques, détectée par test MTT, mais aucune mort cellulaire par nécrose, démontrée par test LDH, laissant entendre que la diminution de leur viabilité cellulaire observée est due à un effet cytostatique lié à leur réorientation métabolique en faveur de la biosynthèse de collagène et/ou d'acide hyaluronique. De plus, nos travaux ont montré que le poids moléculaire des protéines présentes influencerait de manière significative l'activité biologique des fractions.

Les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** pourraient donc être d'un intérêt significatif en tant qu'actifs dermocosmétiques puisque ces extraits favorisent significativement la biosynthèse d'acide hyaluronique et de collagène par les fibroblastes dermiques sans activer la prolifération cellulaire pouvant être à l'origine de certaines pathologies cutanées tels que la fibrose sous-cutanée (Martin *et al.* 1989)

4.2.3 Détermination du potentiel anti-tâche des fractions algales

Avec un intérêt grandissant du public pour les produits anti-tâches, les ingrédients dépigmentants sont de plus en plus souvent incorporés dans les formules cosmétiques. Cependant, des études récentes ont démontré les effets néfastes de certains de ces ingrédients, entraînant leur interdiction ou leur utilisation restreinte par des directives européennes (Couteau et al. 2016; Desmedt et al. 2016). Il est donc important de trouver des ingrédients naturels pouvant être une alternative à l'utilisation d'ingrédients controversés.

Le potentiel anti-tâche des fractions issues d'*U. rigida* et *U. intestinalis* correspondant à l'extrait aqueux (**EA-UR** / **EA-UI**), au rétentat (**R-UR** / **R-UI**), au perméat (**P-UR** / **P-UI**) à la fraction protéique (**PROT1-UR** / **PROT1-UI**) et à la fraction polysaccharidique (**PSA-UR** / **PSA-UI**), a été évalué à des concentrations allant de 100 à 500 µg/ml. A cette fin, la viabilité cellulaire de mélanocytes murins B16F0 ainsi que leur capacité de production de mélanine intra- et extra-cellulaire ont été déterminés en présence des fractions. En parallèle, l'effet des fractions à l'encontre de la tyrosinase, enzyme-clé de la voie de biosynthèse de la mélanine a été évaluée.

a. Effet des fractions algales sur la viabilité cellulaire des mélanocytes

Les mélanocytes ont été cultivés en présence ou non de l'hormone mélanotrope appelée **α-MSH** (melanocyte stimulating hormone), qui provoque chez l'homme la synthèse de mélanine. Elle a été utilisée afin de mimer in vitro les conditions physiologiques des mélanocytes.

L'acide kojique a été utilisé comme témoin positif car il s'agit d'un inhibiteur de tyrosinase, qui agit en particulier en chélatant les ions cuivriques. Cet actif est pour cette raison largement utilisé dans les soins anti-tâches (Cabanès et al. 1994; Bentley. 2006). Cette molécule pose toutefois actuellement des problèmes d'ordre toxicologique. En effet, certaines recherches ont suggéré que l'acide kojique pourrait provoquer une dermatite de contact allergique et une irritation de la peau, voire un cancer à hautes doses (Nakagawa et al. 1995).

Les figures 90.A et 90.B présentent l'effet des fractions algales sur la viabilité de la lignée cellulaire B16F0. Les différentes fractions sont testées à 100 et 500 µg/ml afin de rester dans la même gamme de concentration testée que pour les activités anti-âges vue précédemment. Tout comme l'acide kojique, les fractions issues d'*U. rigida* et *U. intestinalis* ne présentent pas d'effet négatif sur la viabilité cellulaire, avec ou sans hormone **α-MSH** (100 nM). Les molécules composants nos différentes fractions n'induisent pas d'effets négatifs sur la viabilité des mélanocytes.

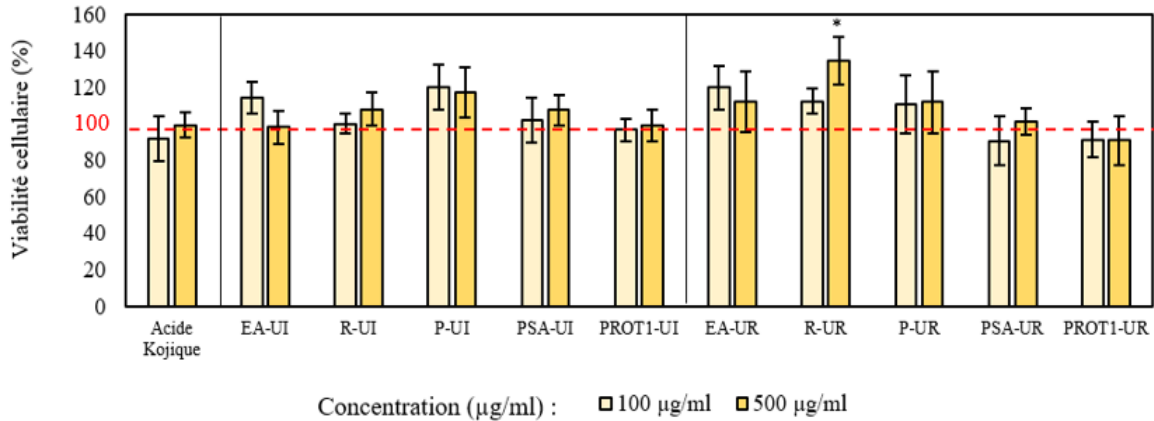


Figure 90.A : Viabilité cellulaire de la lignée mélanocytaire B16F0 après 48 h de culture en présence des différentes fractions issues du procédé Seprosys (*sans* α -MSH). La viabilité des cellules est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type avec $n = 10$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

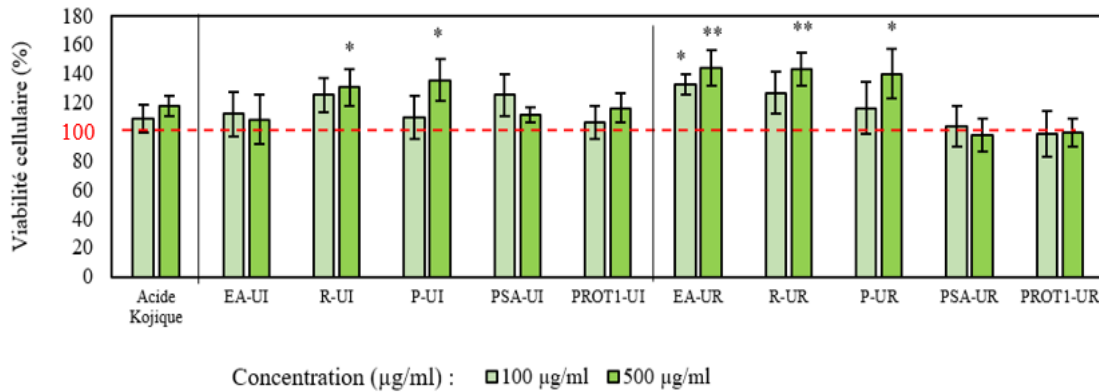


Figure 90.B : Viabilité cellulaire de la lignée mélanocytaire B16F0 après 48 h de culture en présence des différentes fractions issues du procédé Seprosys (avec α -MSH). La viabilité des cellules est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type avec $n = 10$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

a. Effet des fractions algales sur la production de mélanine

Afin d'évaluer le potentiel d'inhibition de la production et de sécrétion de mélanine des fractions issues du procédé Seprosys, la mélanine intra- et extra-cellulaire produite par les mélanocytes B16F0 a été dosée. Tout comme pour le test MTT, les différentes fractions ont été testées à 100 et 500 $\mu\text{g/ml}$. Les expériences ont été réalisées en présence d'hormone α -MSH (100 nM) (figure 91).

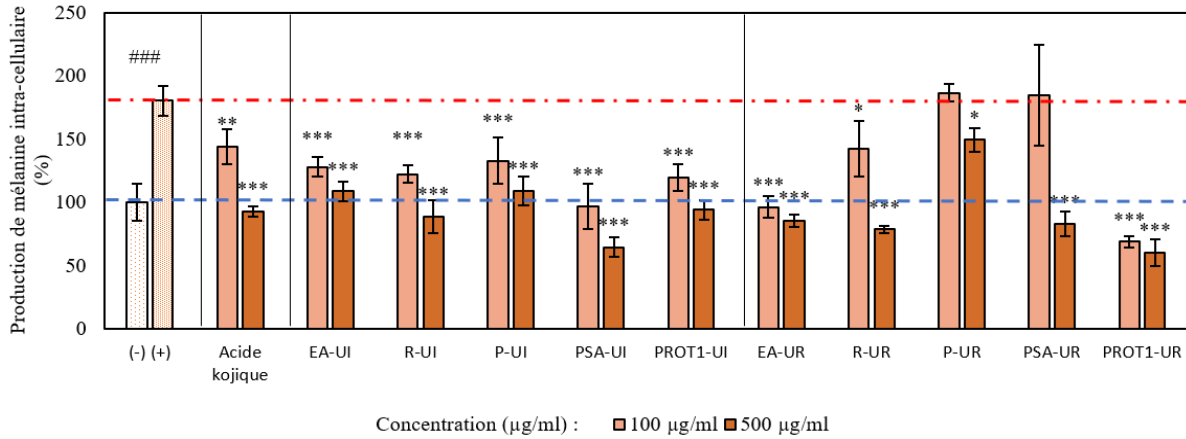


Figure 91 : Production de mélanine intra-cellulaire par la lignée cellulaire B16F0 après 48 h de culture en présence des fractions issues du procédé Seprosys. La quantité de mélanine produite est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type, avec $n = 10$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

L'ajout de l'hormone mélanotrope provoque une augmentation de production de mélanine de 80%. Ce résultat est logique étant donné que l'hormone α -MSH induit la production de mélanine par sa fixation sur un récepteur membranaire spécifique appelé MCR (melanocortin receptor), exprimé à la surface des mélanocytes. Cette augmentation de production de mélanine est visible sur la *figure 92.A*, représentant les mélanocytes en culture avec ou sans α -MSH, et se caractérise par l'apparition de nombreux grains de mélanine présents après traitement avec l'hormone α -MSH (*figure 92.A*).

Le témoin positif, l'acide kojique, provoque une diminution significative de la production de mélanine, de l'ordre de 51% à 500 μ g/ml, qui se traduit par la diminution de la quantité de grains de mélanine visible sur la *figure 92.B*. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Chan et al. 2011). En effet, l'acide kojique inhibe spécifiquement la tyrosinase, diminuant la concentration de mélanine produit

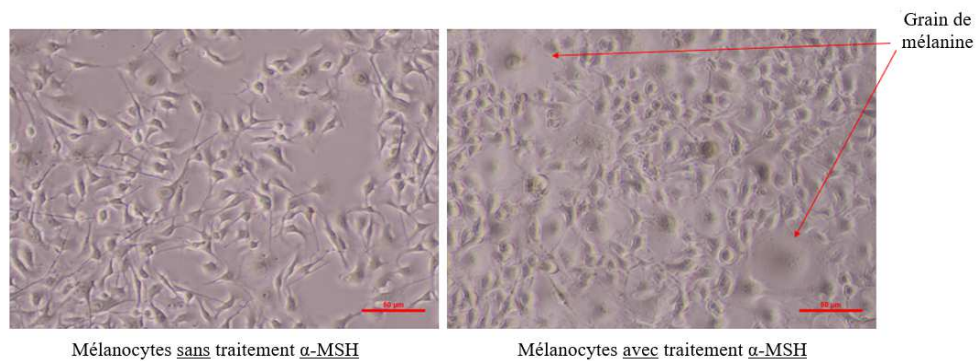


Figure 92.A : Morphologie cellulaire des mélanocytes B16F0 après 48 h de culture en présence ou non d' α -MSH (100 nM). 1 cm équivaut à 50 μ m.

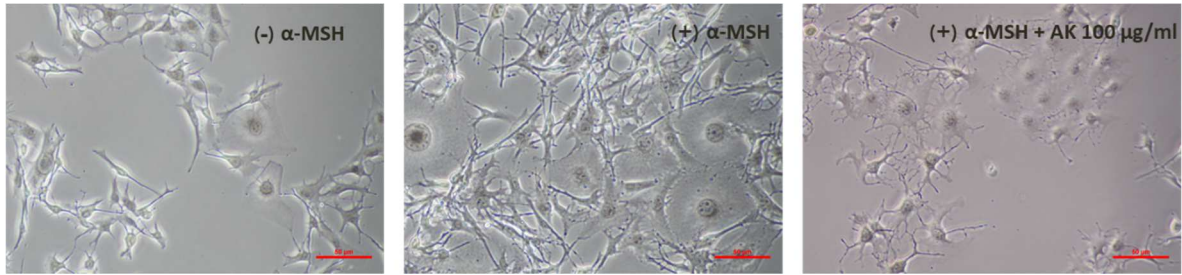


Figure 92.B. Morphologie des mélanocytes B16F0 après 48 h de culture en présence ou non d' α -MSH (100 nM), et en présence d'acide kojique (100 μ g/ml). 1 cm équivaut à 50 μ m.

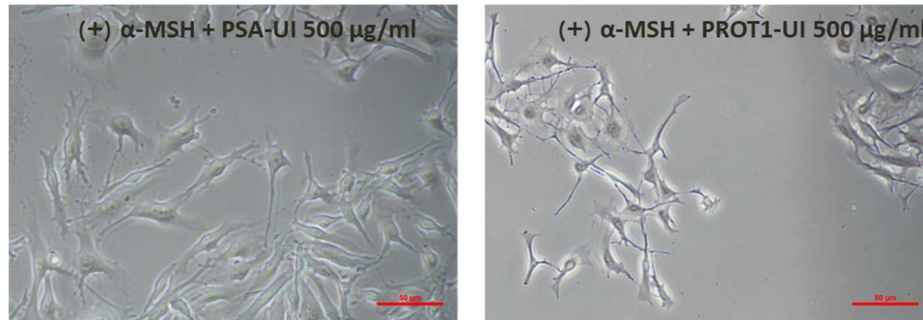


Figure 92.C. Morphologie des mélanocytes B16F0 après 48 h de culture en présence d' α -MSH (100 nM), et en présence des fractions PSA-UI et PROT1-UI (500 μ g/ml). 1 cm équivaut à 50 μ m.

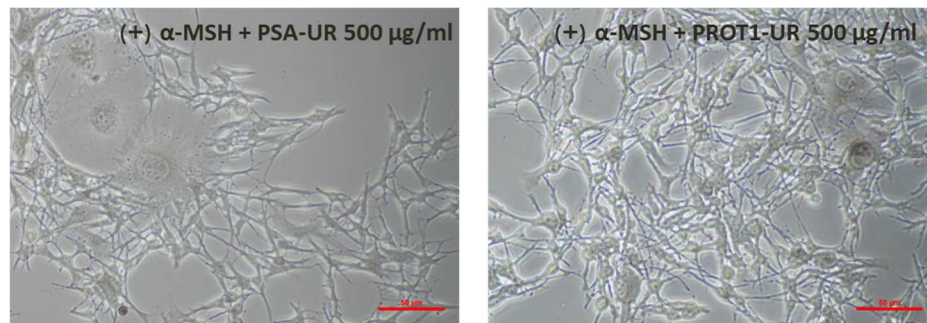


Figure 92.D. Morphologie des mélanocytes B16F0 après 48 h de culture en présence d' α -MSH (100 nM), et en présence des fractions PSA-UR et PROT1-UR (500 μ g/ml). 1 cm équivaut à 50 μ m.

Concernant les fractions provenant de l'extraction d'*U. intestinalis*, une diminution significative et dose-dépendante de la production de mélanine est induite pour la totalité des fractions, avec une diminution de 40 % pour **EA-UI**, de 52 % pour **R-UI** et de 39 % pour **P-UI** à 500 μ g/ml. Ces trois fractions permettent de s'affranchir de l'effet de l'hormone α -MSH et de revenir à un niveau basal de mélanine intracellulaire. La fraction **PROT1-UI** induit une diminution significative de la production de mélanine intracellulaire de 48 % et **PSA-UI** de 75 %, permettant d'atteindre une teneur en deçà du niveau basal de mélanine intracellulaire. La disparition des grains de mélanine induite par les fractions **PSA-UI** et **PROT1-UI** (500 μ g/ml) est visible sur la *figure 92.C*.

En ce qui concerne les fractions provenant de l'extraction d'*U. rigida*, elles présentent des activités similaires aux fractions issus d'*U. intestinalis*, provoquant une diminution de

production de mélanine de 53 % pour **EA-UR** et de 57 % pour **R-UR** à 500 µg/ml. En revanche, la fraction **P-UR** impacte peu la production de mélanine intracellulaire (-18 % à 500 µg/ml), à contrario de la fraction **P-UI**. Les biomolécules responsables de l'activité anti-tâche semblent concentrées dans la fraction **R-UR**, ce qui indique que leur poids moléculaire est supérieur à 15 kDa. Les fractions **PROT1-UR** et **PSA-UR** provoquent quant à elle une diminution très significative de la production de mélanine (67% et 55%), permettant de descendre en dessous du niveau basal de mélanine intracellulaire (*figure 92.D*).

La fraction **PSA-UI** présente une forte activité anti-tâche. Cette fraction contenant majoritairement des polysaccharides sulfatés, il paraît vraisemblable que l'activité anti-tâche soit portée par ces biomolécules. L'activité anti-tâche de polysaccharides sulfatés est en effet déjà connue et démontrée dans la littérature. Par exemple, Song *et al.* (2015) ont démontré que des polysaccharides sulfatés provenant de *Fucus vesiculosus* sont capables de réguler à la baisse la synthèse de la mélanine via l'activation de la kinase ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase). Une autre étude montre que l'activité anti-tâche peut être véhiculée par des polysaccharides sulfatés de poids moléculaires très variables (Park et Choi. 2017). Ce fait peut expliquer que les fractions **R-UI** et **P-UI**, contenant des polysaccharides pourtant de tailles très différentes, affichent toutes deux une activité d'inhibition de la synthèse de mélanine extracellulaire importante.

Les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** présentent elles aussi un effet inhibiteur intéressant sur la production de mélanine par les mélanocytes B16F0. Il est connu que certaines protéines ou polypeptides peuvent présenter ce type d'activité. Ils sont généralement riches en leucine, proline ou tyrosine (Ochiai *et al.* 2016; Golz-Berner *et al.* 2001). Ces acides aminés, principalement la leucine (ou isoleucine) et la proline, font partie des acides aminés libres retrouvés majoritairement dans les protéines des fraction **PROT1-UR** et **PROT1-UI**, à hauteurs respectives de 14,8%, 13,4% et 3,4%, et 17,1%, 5,3% et 7,4% (p.122), mais retrouvés aussi au sein des peptides issues de l'hydrolyse de ces fractions (p.131/132). La présence de ces acides aminés peut expliquer en partie leur activité anti-tâche importante, en particulier pour la fraction **PROT1-UR**. Par ailleurs, une protéine de signalisation de 131 acides aminés, Agouti, est connue pour être un antagoniste du récepteur à l'hormone α -MSH et inhiber la mélanogénèse (Graham *et al.* 1997; Siegrist *et al.* 1997). La protéine Agouti est riche en leucine, proline, et valine (Woychik *et al.* 2001), tout comme les peptides issus de l'hydrolyse des fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR**, en particulier cette dernière (p.132) (Hearing. 2003).

Une synergie entre les polysaccharides et les protéines présents en mélange à des proportions variables dans toutes les fractions algales peut être également envisageable comme l'ont démontré Wang *et al.* (2019), en mettant en évidence la synergie entre un extrait riche en fucoïdane d'*Undaria pinnatifida*, un extrait riche en phlorotannins d'*Ecklonia cava* et des glycosaminoglycanes provenant de tunicier inhibant la tyrosinase de champignons et la synthèse de mélanine dans les cellules de mélanome B16F10 stimulées par l'hormone alpha-mélanocytaire (α -MSH).

b. Effet des fractions algales sur la sécrétion de mélanine

Lors de cette étude, nous avons évalué une des autres voies d'inhibition qui consiste à bloquer la sécrétion et la migration de la mélanine produite par les mélanocytes vers les kératinocytes. Les expériences ont à nouveau été réalisées en présence ou non de l'hormone α -MSH. La *figure 93* présente l'effet des fractions sur la sécrétion de mélanine dans le surnageant cellulaire de la lignée mélanocytaire B16F0. L'acide kojique a une nouvelle fois été utilisé comme témoin positif.

Le traitement avec l' α -MSH induit une augmentation de 73% de la quantité de mélanine sécrétée par les mélanocytes dans le surnageant cellulaire. A l'inverse, l'acide kojique provoque une diminution significative de la sécrétion de mélanine, de l'ordre de 80% à 500 $\mu\text{g/ml}$. Ces résultats sont concordants avec son effet inhibiteur de la production de mélanine vérifié précédemment.

Les fractions provenant de l'extraction d'*U. intestinalis* et d'*U. rigida* induisent une diminution significative et dose-dépendante de la sécrétion de la mélanine, concordante avec leur effet inhibiteur de la production de mélanine intracellulaire. On observe ainsi une diminution de 69% pour **EA-UI**, 72% pour **R-UI**, de 57% pour **P-UI**, de 64% pour **PROT1-UI** et de 81% pour **PSA-UI** à 500 $\mu\text{g/ml}$. La production de mélanine ayant diminué au niveau intracellulaire, il est logique d'observer que la sécrétion de mélanine diminue également, en soulignant toutefois que l'effet est ici encore plus marqué. De la même façon, on observe une diminution de 76% pour **EA-UR**, de 71% pour **R-UR**, de 69% pour **PROT1-UR** et de 44% pour **PSA-UR** à 500 $\mu\text{g/ml}$. L'ensemble de ces fractions limitent donc la sécrétion de la mélanine, ce qui pourrait être dû à une inhibition de la maturation des mélanosomes et/ou leur transfert vers les kératinocytes. C'est en effet le cas d'un extrait provenant d'une macroalgue brune *Alaria esculenta*, qui induit une diminution significative du transfert des mélanosomes (Verdy et al. 2012)

Néanmoins, à contrario de son effet sur la production de mélanine intracellulaire, la fraction **P-UR** impacte de manière bien plus significative la sécrétion de mélanine avec une diminution de 41% à 500 $\mu\text{g/ml}$. Plus précisément, les fractions **P-UI** et **P-UR**, toutes deux inhibitrices fortes de la sécrétion de mélanine par les mélanocytes B16F0, contiennent des biomolécules de poids moléculaire inférieur à 15 kDa. Or les lectines, petites protéines pouvant aller jusqu'à 35 kDa, affichant une forte affinité pour les polysaccharides, sont souvent retrouvées dans la paroi des macroalgues vertes (Poiroux. 2011). Il est connu que ces lectines inhibent le transfert des mélanosomes par mécanisme d'exocytose au niveau des dendrites mélanocytaires limitant donc la sécrétion de mélanine par les mélanocytes (Minwalla et al. 2001). La présence de lectines dans les fractions **P-UI** et **P-UR** n'a pas été démontrée mais elle est vraisemblable et pourrait expliquer l'effet inhibiteur de ces fractions sur la sécrétion de mélanine.

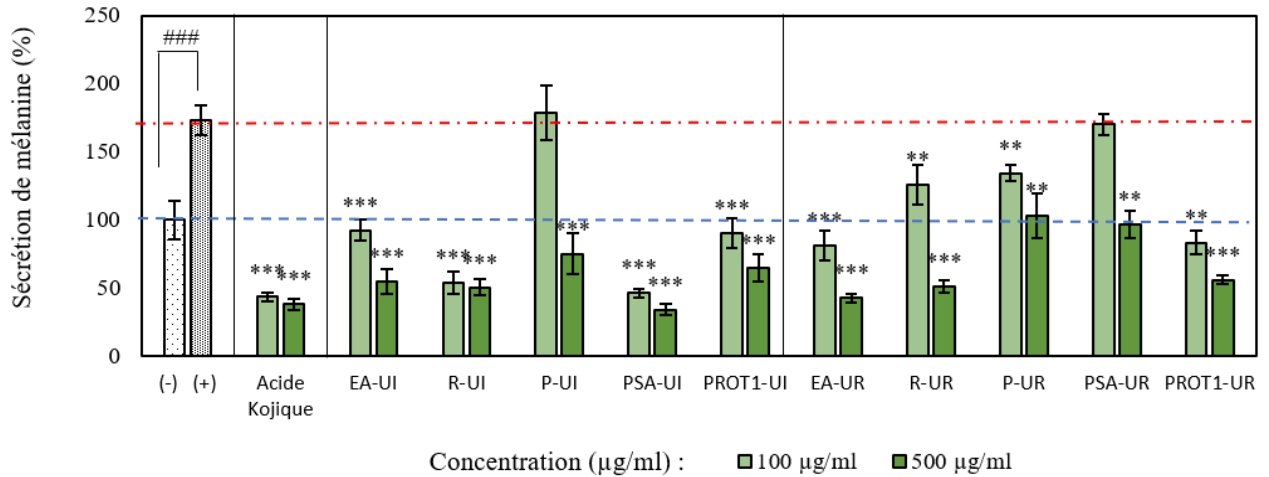


Figure 93 : Sécrétion de mélanine dans le surnageant de culture des mélanocytes B16F0 après 48 h de culture en présence des fractions issues du procédé Seprosys et d' α -MSH (100 nM). La quantité de mélanine produite est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type avec n = 10 répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * (p < 0.05), ** (p < 0.01) and *** (p < 0.001).

c. Inhibition de la tyrosinase

Comme le décrit l'étude bibliographique (p.61), de nombreux extraits algaux montrent une activité inhibitrice d'une enzyme impliquée dans la mélanogénèse, la tyrosinase. La tyrosinase catalyse l'oxydation de son substrat, le 3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) afin de produire la dopaquinone.

Afin d'évaluer la capacité des fractions issues d'*U. rigida* et *U. intestinalis* à inhiber l'activité de la tyrosinase, nous les avons confrontées à l'inhibiteur de référence qu'est l'acide kojique, dont l'IC₅₀ mesuré est de **1.4 µg/ml**. Dans la littérature, la valeur d'IC₅₀ est comprise entre 2,0 et 6,6 µg/ml (Şöhretoğlu et al. 2018; Moonrungsee et al. 2012). Notre résultat se trouve dans le même ordre de grandeur, mais reste plus faible que les valeurs souvent retrouvés.

Les seules fractions montrant une inhibition significative de la tyrosinase sont l'extrait aqueux (**EA-UI**) et le perméat (**P-UI**) issus d'*U. intestinalis*, avec respectivement 20 % et 24 % d'inhibition à 100 µg/ml, ainsi que l'extrait aqueux (**EA-UR**) et le rétentat issu d'issues d'*U. rigida* (**R-UR**) avec 29 % d'inhibition, pour les deux fractions à 100 µg/ml (tableau 22). Cette inhibition reste très modérée en comparaison de l'inhibition induite par l'acide kojique. Elle n'est pas pour autant négligeable étant donné que les fractions actives sont constituées d'un mélange de nombreux composés, à la différence de l'acide kojique, molécule pure.

Tableau 22: Pourcentages d'inhibition de la tyrosinase de champignon des différentes fractions provenant d'*Ulva intestinalis* et d'*Ulva rigida*, et de l'acide kojique à 100 µg/ml.

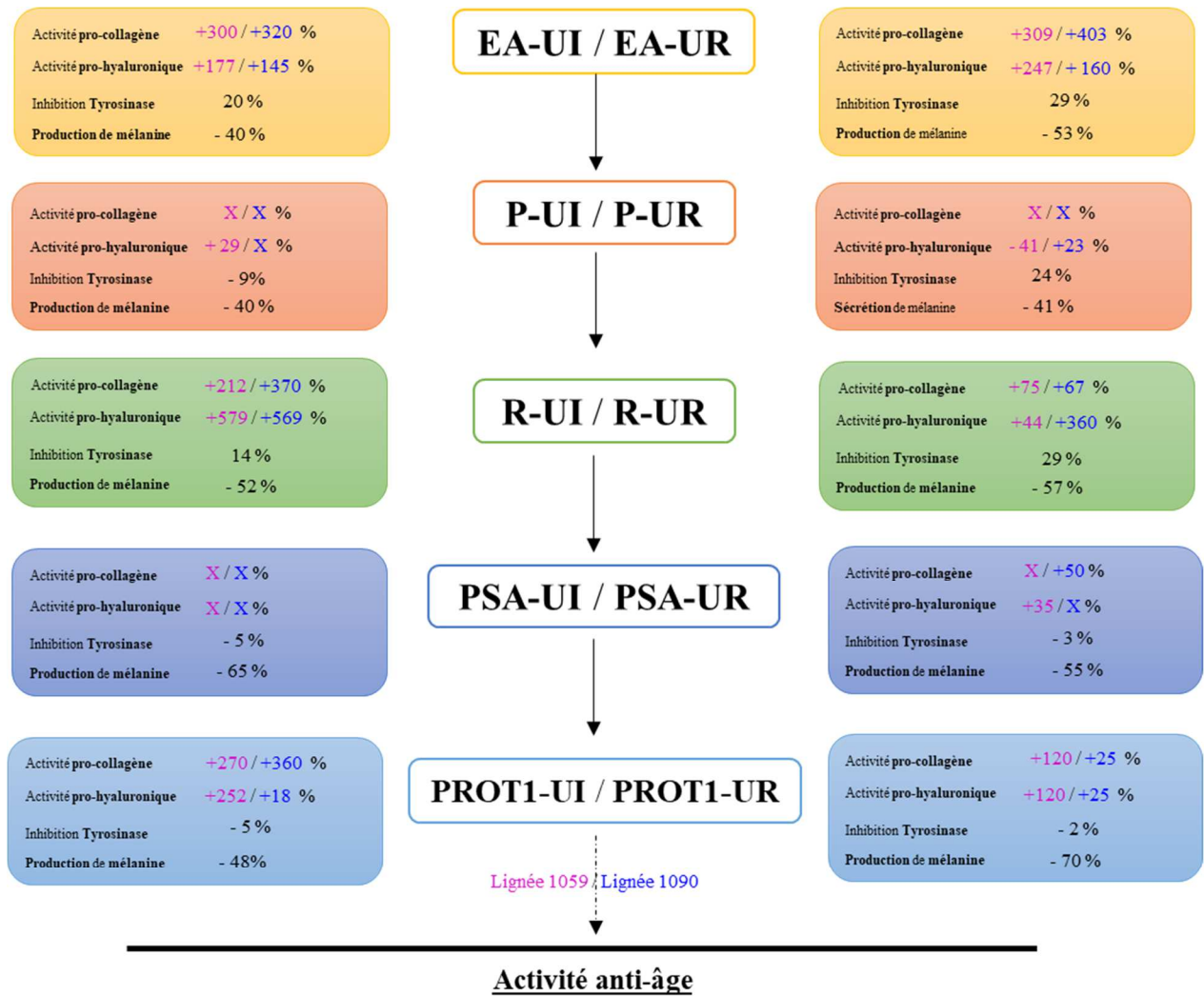
Fraction issue d' <i>U. intestinalis</i>	Pourcentage d'inhibition à [100 µg/ml]	Fraction issue d' <i>U. rigida</i>	Pourcentage d'inhibition à [100 µg/ml]
EA-UI	20 ± 4 % *	EA-UR	29 ± 10 % *
R-UI	14 ± 5 %	R-UR	29 ± 5 % *
P-UI	24 ± 5 % *	P-UR	-9 ± 5 %
PROT1-UI	-5 ± 6 %	PROT1-UR	-2 ± 7 %
PSA-UI	-5 ± 9 %	PSB-UR	-3 ± 3%
Inhibiteur de référence : Acide Kojique		95 ± 4 % à 100 µg/ml	

Cha et al. (2011) ont rapporté que des extraits aqueux provenant d'*Ulva pertusa* et d'*Ulva conglabata* inhibent de 3.5 à 14.7 % de l'activité de la tyrosinase à 100 µg/ml. Nos extraits montrent des activités supérieures. Il est difficile d'appréhender quel type de biomolécule est à l'origine de cette activité inhibitrice, même si les fractions contenant un mélange de biomolécules paraissent plus actives que les biomolécules purifiées.

Les fractions issues de l'extraction d'*Ulva intestinalis* possèdent une très bonne activité anti-tâche dès 100 µg/ml. La plupart des crèmes anti-tâches contiennent généralement des substances tels que l'acide kojique, l'arbutine ou de l'acide ascorbique. C'est le cas des crèmes Depiwhite®(ACM), Aqua lotion® (Amarte), Depiderm® (Uriage) ou encore Wakamin XP®. Mais ces substances tels que l'hydroquinone ou l'acide kojique tendent à provoquer des irritations, des érythèmes ou encore des dermatites. Il est donc important de définir des alternatives à ces inhibiteurs et cela d'ici 2021 (Khotimchenko. 2016). Nos fractions pourraient se placer comme alternatives de ces composants.

Elles pourraient agir sur l'expression des gènes impliqués dans le processus de mélanogénèse. Il serait donc intéressant de confirmer ces résultats et de mettre en évidence les voies de signalisation mises en jeu grâce à une analyse protéomique. Ces fractions pourraient cibler des voies de signalisation mises en jeu lors du processus de mélanogénèse. Par exemple, la voie de signalisation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), considérée comme la voie de signalisation classique jouant un rôle pivot dans la mélanogénèse. D'autres voies de signalisation majeures sont également reconnues pour la médiation des voies mélanogènes, y compris la signalisation par la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK), la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / Akt et les voies de signalisation Wnt / β-caténine (Azam et al. 2017). Toutes ces voies de signalisations peuvent être potentiellement inhibées par un jeu de phosphorylation/déphosphorylation induit au contact de nos différentes fractions.

Les différentes activités mises en évidence lors de ces travaux ont été résumées dans le schéma ci-dessous (figure 94). L'ensemble des fractions issues d'*U. intestinalis* et d'*U. rigida* ont pu être valorisées de domaine dermocosmétique.



Les échantillons provenant *d'Ulva intestinalis* et *d'Ulva rigida* provoquent une réorientation métabolique chez les fibroblastes dermiques.

Diminution de la vitesse de croissance cellulaire
Augmentation de la production de collagène et d'acide hyaluronique **par cellule**

→ Echantillon le plus intéressant en tant qu'anti-âge : le rétentat d'*Ulva intestinalis*

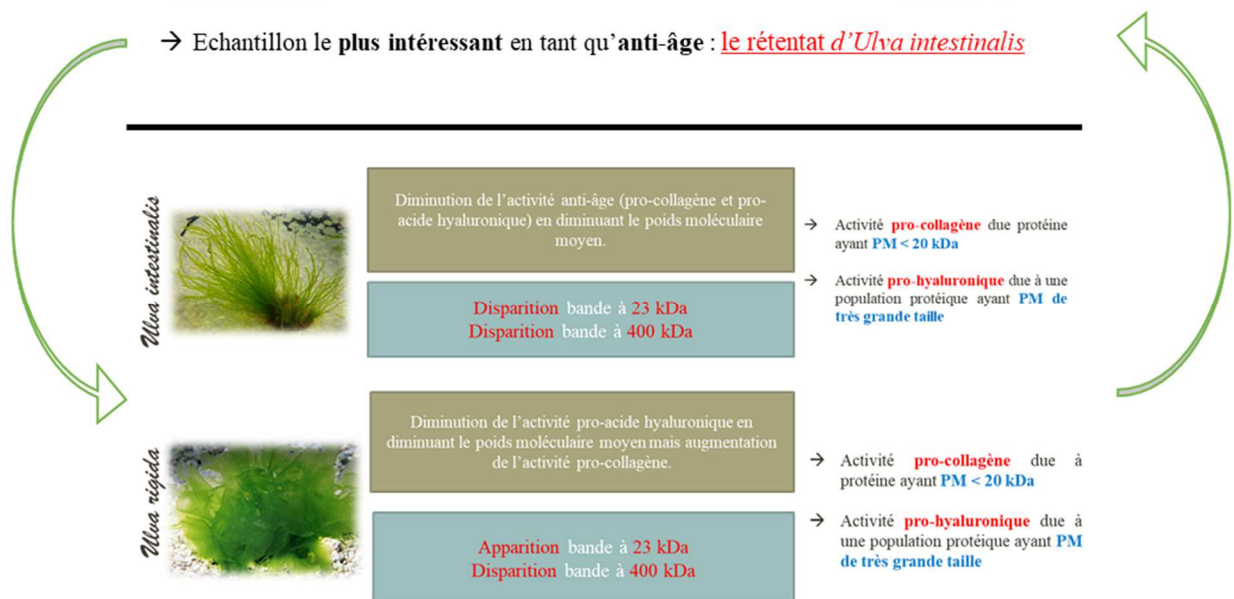


Figure 94: Schéma récapitulatif des activités dermocosmétiques mises en évidence lors de ces travaux

4.3 Etude du potentiel anti-inflammatoire de fractions issues d'*Ulva* sp. en vue de développer un actif ciblant les troubles cognitifs et anxio-dépressifs.

L'industrie nutraceutique est estimée à 184 milliards de dollars, et est en constante évolution. Le chiffre d'affaires attendu en 2022 est de 302 milliards de dollars (Santini et *al.* 2018). Parmi les nombreuses activités traitées par l'industrie nutraceutique, on retrouve les compléments alimentaires traitant les troubles inflammatoires.

On attribue à certains extraits de macroalgues marines **des propriétés anti-inflammatoires**. Ces extraits vont réguler l'inflammation au niveau périphérique (sur des macrophages par exemple) mais aussi au niveau central en influant sur des médiateurs clés de l'inflammation (telles que les cytokines) (Fernando et *al.* 2016). Ces macroalgues peuvent donc représenter une alternative à l'utilisation de drogues conventionnelles pour la prise en charge ou la prévention de pathologies où il est indispensable de contrôler l'inflammation. C'est le cas des pathologies du système nerveux central comme les troubles de l'humeur, la dépression ou l'anxiété (Dinel et *al.* 2011). Dans notre société occidentale, les facteurs favorisant un état inflammatoire sont multiples. L'obésité, par exemple, provoque une inflammation de bas bruit en raison du potentiel pro-inflammatoire des adipocytes. Une mauvaise alimentation trop sucrée ou trop grasse peut entraîner une inflammation induite par une production excessive de cytokines pro-inflammatoires, augmentant indirectement le niveau d'inflammation de l'organisme. Sur la période 1999-2015, 99 composés purifiés provenant de macroalgues marines et possédant une activité neuroprotectrice ont été identifiés et seulement 14 proviennent de macroalgues vertes dont 6 montrent un potentiel anti-inflammatoire (Alghazwi et *al.* 2016). Les macroalgues vertes possédant une activité anti-inflammatoire sont encore peu exploitées et c'est dans ce contexte que l'étude du potentiel anti-inflammatoire des fractions issues d'*U. intestinalis* et d'*U. rigida*, obtenues via le procédé Seprosys a été effectué dans le but de passer sur modèle *in vivo* par la suite.

Afin d'étudier les activités anti-inflammatoires des différentes fractions, nous avons utilisé une lignée de **macrophages murins RAW 264.7**. Pour induire une inflammation périphérique aiguë, nous avons traité les macrophages avec **un lipopolysaccharide bactérien (LPS)**. Le LPS reproduit les effets d'une infection bactérienne en induisant une production massive de cytokines inflammatoires au sein des macrophages. La fixation du LPS sur le récepteur CD14 entraîne son interaction avec les toll-like récepteurs (TLRs) et plus particulièrement avec le TLR4 (Du et *al.* 1999). La réponse au LPS via le TLR4 passe par deux voies de signalisation distinctes : une voie induite de façon précoce et dépendante de MyD88, qui active secondairement les voies de transduction NFκB et MAPKinases et une voie plus tardive indépendante de MyD88.

Le potentiel anti-inflammatoire des fractions issues d'*U. rigida* et *U. intestinalis* correspondant au perméat (**P-UI** / **P-UR**), à la fraction protéique (**PROT1-UI** / **PROT1-UR**), à la fraction peptidique (**PROT2-UI** / **PROT2-UR**), à la fraction polysaccharidique (**PSA-UI** / **PSA-UR**) et à la fraction polysaccharidique de bas poids moléculaire (**PSB-UI** / **PSB-UR**), a été évalué à des concentrations allant de 10 à 500 µg/ml.

La **dexaméthasone** et le **fucoïdane**, un polysaccharide sulfaté provenant de macroalgues brunes, ont été utilisés comme témoins positifs (*figure 95*).

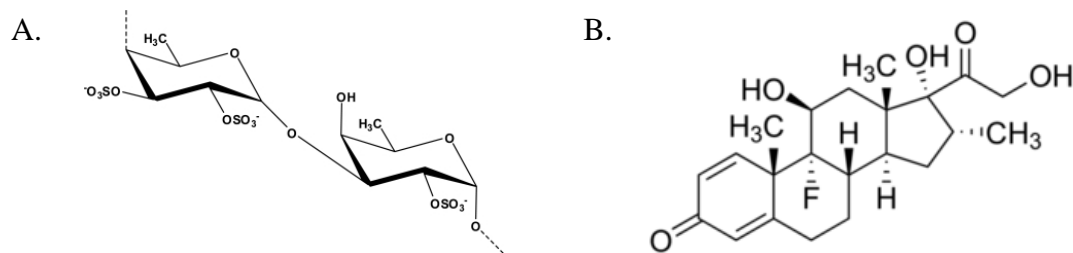


Figure 95: (A) Structure chimique du fucoïdane provenant de *Fucus vesiculosus*, (B) structure chimique de la dexaméthasone

La **dexaméthasone** est un corticoïde de synthèse diminuant l'inflammation induite par le LPS dans des macrophages en inhibant l'expression du gène IL-1 β en bloquant l'activation des voies NF- κ B et AP-1 (Jeon et al. 2000). Le **fucoïdane** possède une activité anti-inflammatoire connue et démontrée : il inhibe la production de NO induite par le LPS dans des macrophages RAW 264.7 en diminuant l'expression de l'iNOS (Oxyde nitrique synthase inductible), COX-2 (cyclooxygénase-2) et de certaines cytokines tels que le facteur de nécrose tumorale TNF- α et les interleukines IL-6 et IL-1 β (Park et al. 2011; Park et al. 2017).

4.3.1 Effet des fractions algales sur la viabilité cellulaire des macrophages

La *figure 96* présente l'effet des fractions algales issues d'*U. intestinalis* et *U. rigida* sur la viabilité cellulaire de la lignée de macrophages RAW 264.7. Les témoins positifs, le **fucoïdane** (500 µg/ml) et la **dexaméthasone** (0,392 µg/ml) n'induisent pas d'effet sur la viabilité cellulaire.

A la concentration la plus élevée, la viabilité cellulaire est respectivement diminuée de 55% et 76 % en présence de **PROT1-UI** et **PROT1-UR**, et de 45 % en présence de **PSA-UI** et **PSA-UR**. Les fractions contenant les biomolécules de hauts poids moléculaires impactent donc négativement la viabilité des macrophages. Les fractions de bas poids moléculaires, **P-UI** et **P-UR**, n'induisent pas d'effets négatifs sur la viabilité cellulaire. Au contraire, elles semblent induire une augmentation de la prolifération cellulaire, de l'ordre de 50% à 10 µg/ml.

L'hydrolyse des fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR**, tout comme celle des fractions **PSA-UI** et **PSA-UR**, permet par ailleurs de s'affranchir de la diminution induite par les fractions de hauts poids moléculaires. A 500 µg/ml, les fractions **PROT2-UI** et **PROT2-UR** induisent en effet une augmentation de la viabilité cellulaire respectivement de 50% et 18%, tout comme **PSB-UI** et **PSB-UR** (+25% et de +53%). De façon générale, les résultats observés sont similaires pour les deux macroalgues testées.

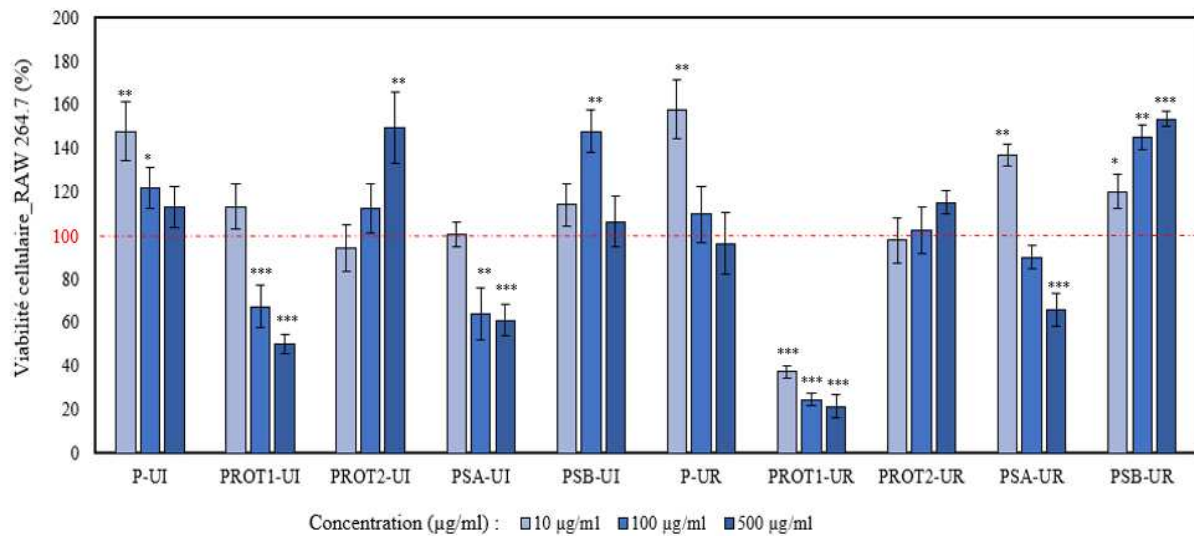


Figure 96: Viabilité cellulaire des macrophages RAW 264.7 après 24 h de culture en présence des différentes fractions issues du procédé Seprosys. La viabilité des cellules est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type, n = 10 répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) and *** ($p < 0,001$).

4.3.2 Effet des fractions algales sur la production de monoxyde d'azote (NO)

Les tests *in vitro* sont couramment utilisés pour évaluer l'activité anti-inflammatoire d'extraits ou hydrolysats. La lignée cellulaire de macrophages RAW 264.7 cultivée *in vitro* permet de quantifier la production dans le surnageant de culture des molécules de signalisation importantes telles que TNF- α , IL-1 β , IL-6 et le monoxyde d'azote (NO), qui jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire. Lors de cette étude, la concentration en NO a été quantifiée à l'aide du réactif de Griess (Guevara et al. 1998).

Le **monoxyde d'azote (NO)** est un biomédiateur synthétisé par les NO synthases (NOS), une famille de trois isoenzymes. Il est impliqué dans les réponses immunitaires par les macrophages activés par des cytokines. Le NO est un neurotransmetteur puissant au niveau des

synapses neuronales et contribue à la régulation de l'apoptose. Par conséquent, les inhibiteurs de NOS représentent un progrès thérapeutique important dans la gestion des maladies inflammatoires. C'est dans ce contexte que l'impact de nos fractions sur la surproduction de NO par des macrophages murins RAW 264.7 en condition pro-inflammatoire induite par le LPS a été évalué. Les *figures 97.A* et *97.B* présentent l'effet des fractions sur la production de NO (sans et avec stimulation au LPS) de la lignée de macrophages RAW 264.7.

Sans stimulation au LPS, les fractions de bas poids moléculaires (**P-UI/P-UR**, **PROT2-UI/PROT2-UR** et **PSB-UI/PSB-UR**) ne provoquent pas d'augmentation de la concentration de NO dans le surnageant cellulaire, tout comme les témoins positifs.

Les fractions **PROT1-UI/PROT1-UR** et **PSA-UI/PSA-UR** contenant des biomolécules de hauts poids moléculaires induisent au contraire une augmentation très significative de la concentration en NO dans le surnageant cellulaire. Les fractions **PROT1-UI/PROT1-UR** provoquent pour leur part une augmentation de la concentration en NO de 412 % et de 423% à 100 µg/ml alors que les fractions **PSA-UI/PSA-UR** provoquent une augmentation plus modérée, de 108% et 288% à 500 µg/ml. Le potentiel pro-inflammatoire des biomolécules de hauts poids moléculaires est connu, en particulier celui des protéines (Faria et *al.* 2013).

Concernant les fractions **PSA-UI/PSA-UR**, les résultats rejoignent ceux des travaux portant sur un extrait d'ulvanes (51 kDa) provenant d'*Ulva pertusa* démontrant que ces polysaccharides sulfatés induisent considérablement la production de NO et de cytokines (Tabarsa et *al.* 2012). De même, deux autres études relatent la capacité des ulvanes issus d'*Ulva intestinalis* (72 kDa et 60 kDa) à stimuler la production de NO, IL-1 β , IL-6 et TNF- α . (Tabarsa et *al.* 2018 ; Jiao et *al.* 2011). Une étude a montré que le degré de sulfatation élevé peut jouer un rôle dans le potentiel pro-inflammatoire de polysaccharides sulfatés (Chen et *al.* 2008). Le degré de sulfatation des fractions **PSA-UI** et **PSA-UR** peut donc aussi expliquer leur potentiel pro-inflammatoire. Lors de la thèse précédente, il a été prouvé qu'une désulfatation partielle intervient lors de la dépolymérisation. Cette désulfatation va dépendre des conditions et du temps de traitement mais l'impact sur le degré de sulfatation pourrait induire, ici, la perte de cette activité pro-inflammatoire pour les fractions **PSB-UI** et **PSB-UR**.

L'hydrolyse des protéines ou polysaccharides présents respectivement dans les fractions **PROT1-UI/PROT1-UR** et **PSA-UI/PSA-UR** permet donc logiquement de s'affranchir de leur activité pro-inflammatoire.

Compte-tenu de leur activité pro-inflammatoire avérée, les fractions **PROT1-UI/PROT1-UR** et **PSA-UI/PSA-UR** ne peuvent pas être utilisées en tant que ou au sein d'un actif anti-inflammatoire. Elles ont en conséquence été éliminées de l'étude et n'ont pas été testées plus avant.

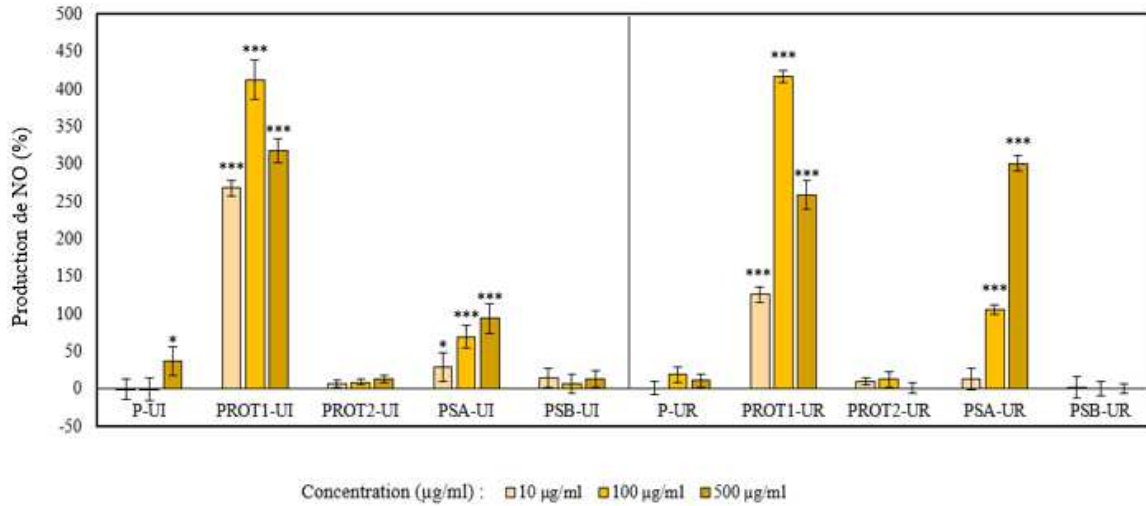


Figure 97.A: Production de monoxyde d'azote dans le surnageant de culture des macrophages RAW 264.7, sans stimulation au LPS, après 24 h de culture en présence des différentes fractions issues du procédé Seprosys. La quantité de monoxyde d'azote produite est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type avec $n = 8$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) and *** ($p < 0,001$).

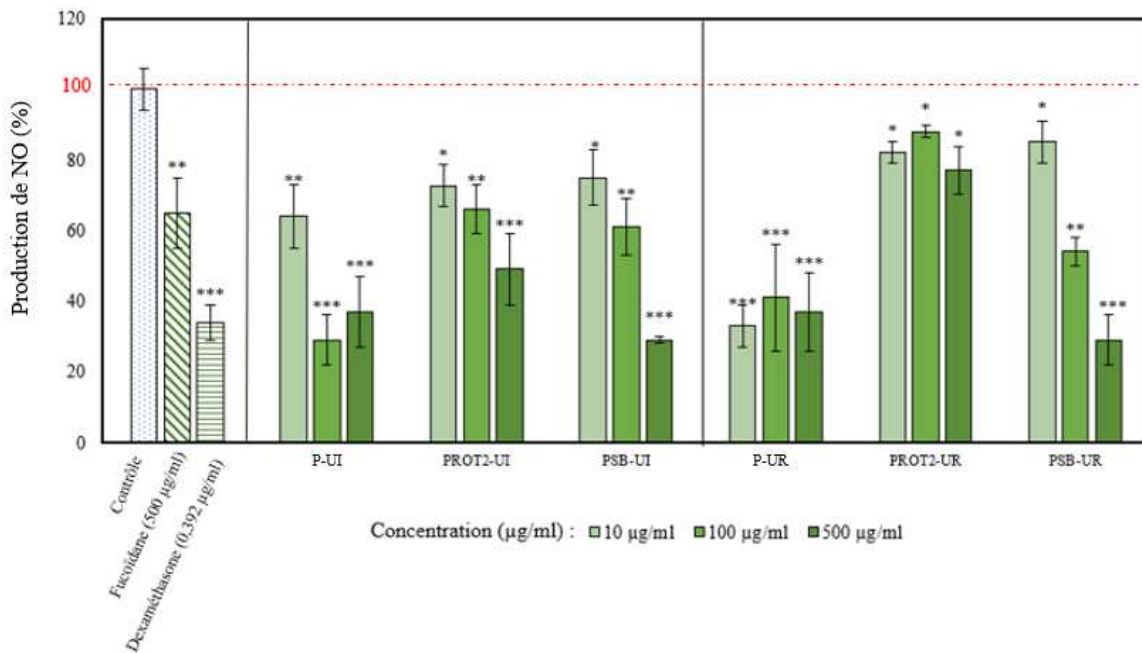


Figure 97.B . Production de monoxyde d'azote dans le surnageant de culture des macrophages RAW 264.7, avec stimulation au LPS, après 24 h de culture en présence des différentes fractions issues du procédé Seprosys. La quantité de monoxyde d'azote produite est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type, avec $n = 8$ répétitions. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) and *** ($p < 0,001$).

La figure 97.B présente l'effet des fractions sur la production de NO par les macrophages RAW 264.7 **avec stimulation au LPS**. L'ajout du LPS induit une augmentation de la quantité totale de NO produite dans le surnageant de culture sous conditions contrôles, qui passe de 8,2

μM sans LPS à $70 \mu\text{M}$ avec LPS. Une nette différence morphologique est également induite par la stimulation au LPS (*figure 98*) : les macrophages traités au LPS paraissent gonflés et dendritiques comparés aux macrophages non traités.

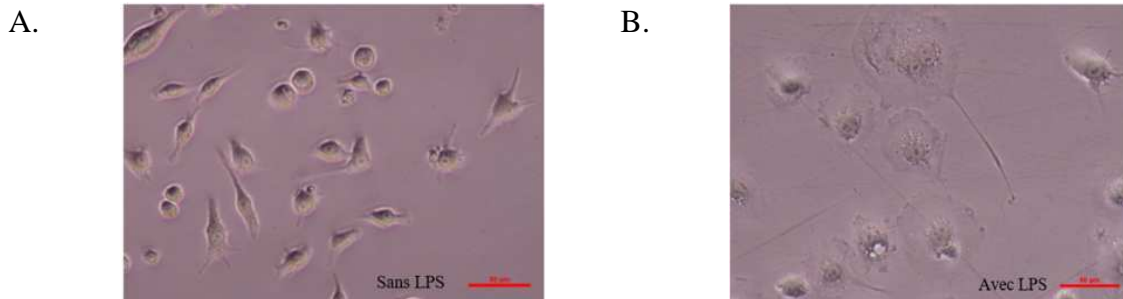


Figure 98 : (A) Morphologie des macrophages RAW 264.7 après 12 h de contact sans traitement au LPS, (B) morphologie des macrophages RAW 264.7 après 12 h de contact avec traitement au LPS ($1 \mu\text{M}$). 1 cm équivalent à $50 \mu\text{m}$.

Le **fucoïdane** et la **dexaméthasone** induisent respectivement une diminution de production de NO de 35% à $500 \mu\text{g/ml}$ et de 66% à $0,392 \mu\text{g/ml}$, ce qui est en accord avec la littérature et permet donc de valider les méthodologies de culture des macrophages et de dosage du NO employées (Park et al. 2011; Park et al. 2017).

Les fractions issues d'*U. intestinalis* présentent des activités anti-inflammatoires très intéressantes. **P-UI**, **PROT2-UI** et **PSB-UI** induisent une diminution significative de la production de NO, respectivement de 71% à $100 \mu\text{g/ml}$, 51% à $500 \mu\text{g/ml}$ et 71% à $500 \mu\text{g/ml}$. Des observations similaires peuvent être faite pour les fractions issues d'*U. rigida* (**P-UR**, **PROT2-UR** et **PSB-UR**), qui induisent elles aussi une diminution importante de la production de NO : respectivement 67% à $10 \mu\text{g/ml}$, 23% à $500 \mu\text{g/ml}$ et 60% à $500 \mu\text{g/ml}$.

Les fractions **P-UI** et **P-UR**, qui contiennent des polymères ayant un PM inférieur à 15kDa , induisent la diminution la plus importante à de basses concentrations. Elles peuvent contenir un nombre important et varié de molécules organiques telles que des oligosaccharides ou polysaccharides, des peptides ou de petites protéines telles que les lectines. Les lectines sont de petites protéines souvent associées à un mono ou oligosaccharide se retrouvant dans la paroi algale. Elles ont démontré, lors de différentes études, une activité anti-inflammatoire intéressante (Singh et al. 2015). Da Conceição Rivanor et al. (2014) ont démontré qu'une lectine provenant d'une macroalgue verte *Caulerpa cupressoides*, riche en valine, glycine, alanine et asparagine possédait un potentiel anti-inflammatoire impliquant l'inhibition de l'IL- 1β et du TNF- α . Il serait donc intéressant de caractériser les fractions **P-UI** et **P-UR** afin de déterminer si elles contiennent des peptides contenant ces acides-aminés, ou encore de démontrer la présence de lectines pouvant être à l'origine de cette activité anti-inflammatoire.

Les fractions **PROT2-UI** et **PROT2-UR** possèdent elles aussi de nombreux peptides et montrent une activité anti-inflammatoire intéressante. Diverses études récentes ont montré que des hydrolysats de protéines ou de peptides étaient dotés d'activités anti-inflammatoires. C'est

le cas d'un peptide purifié **KAQAD** provenant de *Pyropia yezoensis*, montrant une activité anti-inflammatoire très intéressante, diminuant de 66 % l'inflammation induite par le LPS à 1 µg/ml (Lee et al. 2015). Le fait qu'un peptide de faible taille ait cette propriété peut expliquer l'activité de la fraction **PROT2-UI** qui contient de nombreux peptides de 2 à 10 acides aminés parmi lesquels pas moins de 15 pentapeptides, alors que la fraction **PROT2-UR** présente une proportion plus importante de peptides de poids moléculaires supérieurs à 3 kDa, correspondant à des peptides de 20 acides aminés environ. Les travaux de Cian et al. (2018) et Senevirathne, et al. (2010), portant sur des hydrolysats peptidiques obtenus par digestion enzymatique impliquant le cocktail Flavourzyme[®], vont également dans ce sens : le premier, issu d'*Ulva* sp. et contenant des peptides de moins de 8 acides aminés (MW inférieur à 1 kDa), régule la production de cytokines en inhibant la voie NF-κB chez des macrophages spléniques, tandis que le second, provenant de *Porphyra tenera*, inhibe efficacement la production de NO induite au LPS par les macrophages RAW 264.7. Autre exemple, une séquence peptidique (**VECYGPNRPQF**) provenant d'une microalgue marine, *Chlorella* provoque une diminution dose-dépendante de la production de NO (macrophages RAW 264.7 stimulés au LPS) et induit une diminution de l'expression de l'iNOS (Cherng et al. 2010). Cette séquence peptidique n'a pas été retrouvée dans les peptides issus de l'hydrolyse de **PROT1-UR** et de **PROT1-UI** (p.131/132). Néanmoins, on retrouve des similarités. Un peptide, issu de l'hydrolyse de **PROT1-UR**, comportant 11 acides aminés (T_R 30 minutes), contient les séquences **VE** et **GP** commune à la séquence peptidique retrouvé chez *Chlorella*. De même, un peptide, issu de l'hydrolyse de **PROT1-UI**, comportant 12 acides aminés (T_R 33 minutes), se termine par la séquence **PTQF**. Ces enchaînements peptidiques communs pourraient-ils aussi expliquer l'activité anti-inflammatoire de ces fractions ? La présence en grand nombre de valine, isoleucine, phénylalanine ou encore de proline, très souvent présents au sein des peptides possédant une activité anti-inflammatoire (Chalamaiah et al. 2018), pourrait elle-aussi expliquer l'activité anti-inflammatoire de ces fractions et particulièrement la différence d'activité entre **PROT2-UI** et **PROT2-UR** puisqu'ils sont retrouvés en quantité plus importante dans la fraction **PROT2-UI** ?

Concernant les fraction **PSB-UI/PSB-UR**, le potentiel anti-inflammatoire des polysaccharides sulfatés n'est plus à démontrer et fait l'objet de nombreuses publications (Jiao et al. 2011). Sanjeewa et al. (2017) ont testé le potentiel inflammatoire de différentes fractions de polysaccharides sulfatés hydrolysés provenant de la macroalgue brune *Sargassum horneri* et ont obtenu avec leur meilleure fraction concentrée à 100 µg/ml une inhibition de 50 % de l'inflammation induite au LPS. Ces résultats sont similaires à ceux obtenue pour **PSB-UI** et **PSB-UR** lors de notre étude. Une autre étude confirme que les ulvanes de bas poids moléculaire provoquent une réduction significative de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induites au LPS, notamment la production d'IL-1β, IL-6, TNF-α et NO (Rahimi et al. 2016).

En résumé, les fractions **P-UR**, **P-UI** et **PROT2-UI** présentent une activité anti-inflammatoire supérieure à celles de la dexaméthasone, qui est un composé pur. Ces fractions recèlent donc un potentiel fort en tant qu'ingrédients anti-inflammatoires, valorisables en nutraceutique. Il serait toutefois intéressant de mettre en évidence le ou les composés à l'origine de l'activité anti-inflammatoire en réalisant une étude structure-fonction plus poussé et par la suite de diminuer la concentration effectrice.

4.3.4 Analyses des transcrits pour la mise en évidence du mécanisme d'action

Le potentiel anti-inflammatoire des différentes fractions a été évalué par des analyses des transcrits visant la quantification du niveau d'expression des médiateurs pro- et anti-inflammatoires suivants : l'oxyde nitrique synthase (iNOS, enzyme produisant le NO), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), interleukine-6 (IL-6), cyclo-oxygénase 2 (Cox-2), interleukine-1 β (IL-1 β), interféron- β (IFN β), facteur de nécrose tumorale (TNF- α), facteur de croissance transformant (TGF β) et l'interleukine 10 (IL-10).

Après avoir réalisé des RT-PCR quantitatives à partir d'échantillons d'ADNc extraits de macrophages RAW 264.7 cultivés en présence des fractions de bas poids moléculaire issues d'*U. rigida* (**P-UR**, **PROT2-UR** et **PSB-UR**), nous avons évalué l'expression des gènes sélectionnés (figure 99). Les cellules n'ayant pas reçu de traitement ont été considérées comme cellules contrôles. Les concentrations testées ont été choisi en fonction des résultats obtenus lors des tests sur la viabilité cellulaire et lors des dosages du monoxyde d'azote.

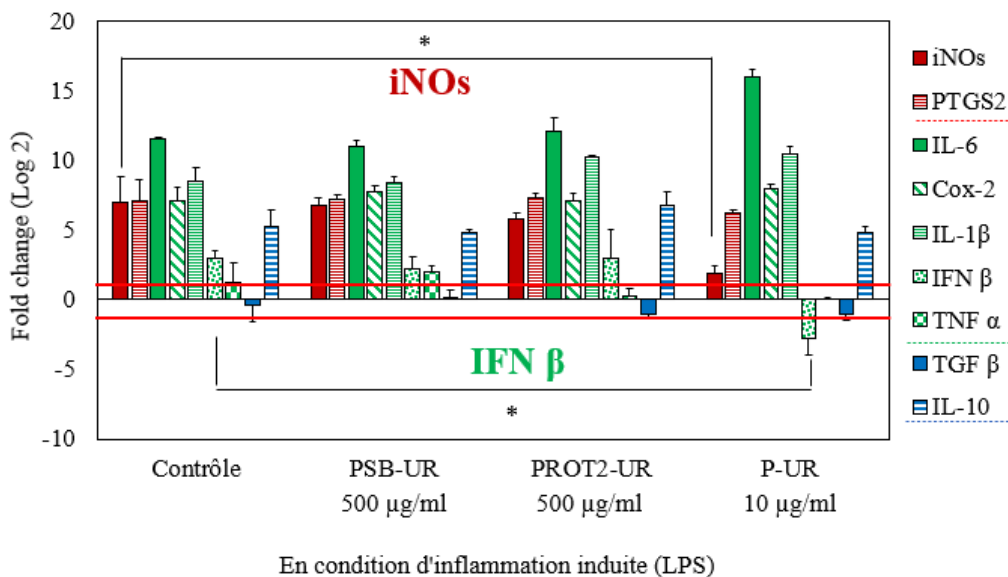


Figure 99: Effets des fractions P-UR, PSB-UR et PROT2-UR sur l'expression de gènes codant pour des médiateurs pro- et anti-inflammatoires en présence de LPS (1 μ M). Les conditions contrôles sont représentées par les valeurs encadrées par les traits rouge. * $p > 0.05$

Les profils de transcription des gènes correspondant aux différents médiateurs obtenus avec les fractions **PSB-UR** et **PROT2-UR** se sont révélés similaires à ceux des cellules contrôles. Ces fractions n'impactent donc pas l'expression des gènes sélectionnés et le potentiel anti-inflammatoire mis en évidence par quantification de la production de NO par les macrophages RAW 264.7 n'est pas corrélé avec une sur- ou sous expression de l'un de ces médiateurs pro- ou anti-inflammatoires. Sachant que l'inhibition de la production de NO peut parfois être due à une interaction avec le récepteur toll-like 4 (TLR4), empêchant la fixation et la formation des complexes TLR4-IRAK4 et TLR4-TRIF, comme le fait une glycoprotéine provenant de *Pyropia yezoensis* (Shin et al. 2011), il serait intéressant d'explorer ce mécanisme

d'action pour mieux comprendre l'activité anti-inflammatoire des fractions **PSB-UR** et **PROT2-UR**.

En revanche, concernant la fraction **P-UR**, on remarque une diminution significative de l'expression du gène codant pour l'iNOS passant d'un Log₂ fold change de 7 à 2, ce qui indique que le niveau d'expression d'iNOS est 32 fois plus faible après traitement. La fixation du LPS sur les récepteurs TLR4 est connue pour induire la production de médiateurs pro-inflammatoires incluant le NO et des cytokines telles que TNF- α , IL-1 β et IL-6, par activation des voies de signalisation NF- κ B et MAPK (Chen *et al.* 2002).

Après stimulation des macrophages, les protéines NF- κ B cytosoliques sont transportées dans le noyau où elles induisent la transcription de gènes pro-inflammatoires, incluant iNOS et Cox-2, ainsi que les gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires (*figure 100*).

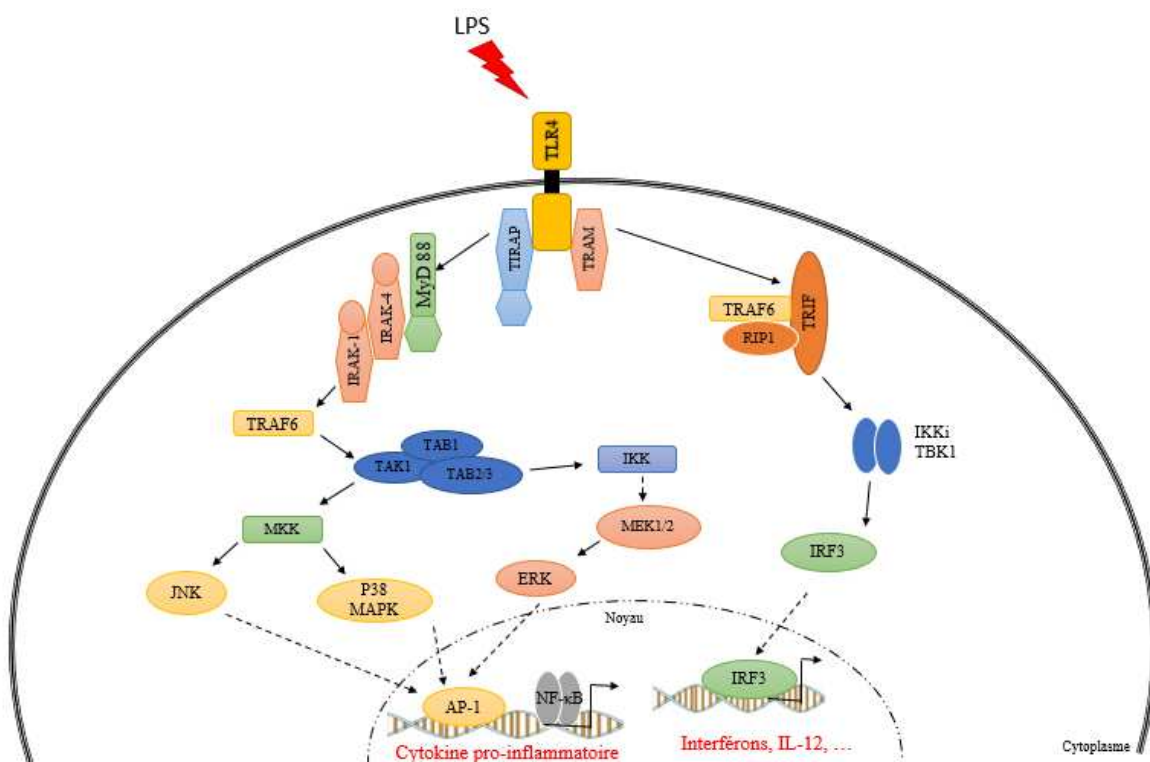


Figure 100: Vue simplifiée des voies de signalisations induite par le LPS. Le LPS se lie à TLR4 et active les facteurs de transcription AP-1, NF- κ B et IRF3 par les voies MyD88 et TRIF (Tsuchiya *et al.* 2009)

Au cours de la cascade de transduction du signal, un certain nombre de protéines sont phosphorylées. La dérégulation de ces phosphorylations est d'ailleurs une cause connue de maladies inflammatoires chroniques liées à la suractivation de la voie NF- κ B et l'inhibition des protéines associées à ces phosphorylations est une des stratégies prometteuses de traitement contre ces pathologies ou pathologies associées (Viatour *et al.* 2005; Xiao *et al.* 2002). Dans cette logique, les travaux de Lee *et al.* (2017) ont démontré qu'un extrait aqueux de la macroalgue verte *Codium fragile* concentré à 100 μ g/ml induit une diminution de l'expression d'iNOS en inhibant la phosphorylation de la voie NF- κ B et plus particulièrement la

phosphorylation des MAPKs, de JNK et de ERK 1/2. De même, l'hydrolysate peptidique provenant d'*Ulva* sp. et le pentapeptide **KAQAD** issu de *Pyropia yezoensis*, présentés pour comparaison avec nos fractions algales dans le chapitre 4.3.2, semblent réguler la production de cytokines pro-inflammatoires comme le NO en inhibant l'induction des voies NF- κ B, MAPK-p38 et JKN pour le premier (Cian et al. 2018) et en régulant négativement la phosphorylation de la voie des MAPK, de la protéine p38 et de c-jun pour le second (Lee et al. 2015). Les niveaux d'entrée sont donc multiples pour identifier le mode d'action précis de la fraction **P-UR**, qui pourrait potentiellement cibler les mêmes voies de signalisation, mais cela reste à démontrer et constitue une perspective de ce travail à explorer.

On remarque également que la fraction **P-UR** induit la sous-expression du gène IFN β . L'IFN- β est une protéine activant les macrophages lors d'une infection, qui fait partie des cytokines anti-inflammatoires. La sous-expression d'IFN β induite par la fraction **P-UR** peut paraître contradictoire avec son activité anti-inflammatoire démontrée mais peut également s'expliquer par cette même activité : la diminution de l'inflammation induite par la réduction de l'expression d'iNOS par la fraction **P-UR** est en effet susceptible d'entraîner en conséquence une diminution de l'expression de cytokines anti-inflammatoires telles qu'IFN- β , rendue moins nécessaire dans un contexte moins inflammatoire. De plus, l'IFN- β est fonctionnellement liée à d'autres cytokines car elle peut être induit par certaines d'entre elles et ses actions peuvent être potentialisées ou au contraire subir des antagonismes par d'autres (Kopitar-Jerala. 2017).

4.3.5 Etudes *in vivo* d'un effet anti-anxiété et anti-dépresseur des fractions PSB-UR, PROT2-UR et P-UR

Sur la base des activités anti-inflammatoires très significatives démontrées dans les deux chapitres précédents pour les fractions **P-UR**, **PROT2-UR** et **PSB-UR**, celles-ci ont été sélectionnées pour évaluer leur potentiel anxiolytique et antidépresseur.

Cette étude a été menée par le laboratoire NutriNeuro de l'INRA-Université de Bordeaux, sur un modèle de souris diabétiques et présentant des troubles anxiodépresseurs dus à la consommation d'un régime hypercalorique enrichi en gras (**HFD**). A cette fin, le régime des souris a été enrichi ou non, par ajout des fractions **P-UR**, **PROT2-UR** et **PSB-UR** dans les eaux de boisson. Le métabolisme énergétique (sensibilité à l'insuline et tolérance au glucose) et les comportements anxiodépresseurs des souris ont été analysés.

Chaque cohorte de souris comporte un groupe de 5 souris standard (Souris **STD**), un groupe de 5 souris standard ayant reçu la fraction algale (Souris **STD + algue** ; fractions **PSB-UR**, **PROT2-UR** et **P-UR**), un groupe de souris ayant un régime hypercalorique enrichi en gras (Souris **HFD**) et un groupe de souris ayant reçu le régime **HFD + algue (PSB-UR, PROT2-**

UR et P-UR) (figure 101).

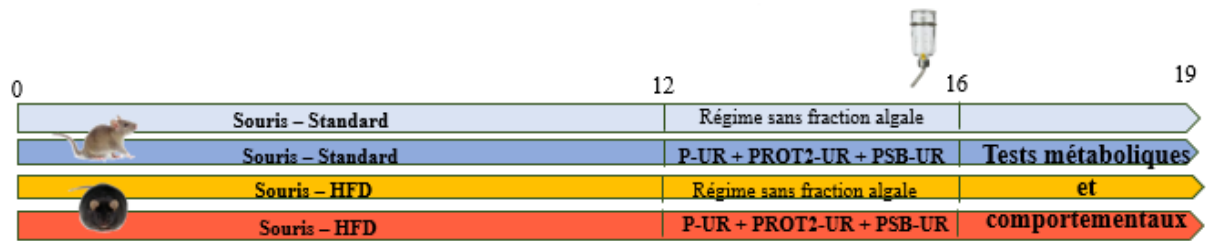


Figure 101 : Présentation des différentes cohortes de souris utilisées afin de tester l'efficacité des fractions algales sur l'amélioration des troubles anxiodépressifs et cognitifs.

Les différents groupes de souris ont été soumis à leur régime particulier durant 16 semaines puis l'étude du métabolisme et les tests comportementaux (cognition, anxiété et dépression) ont été effectués sur une période d'un mois (figure 102).

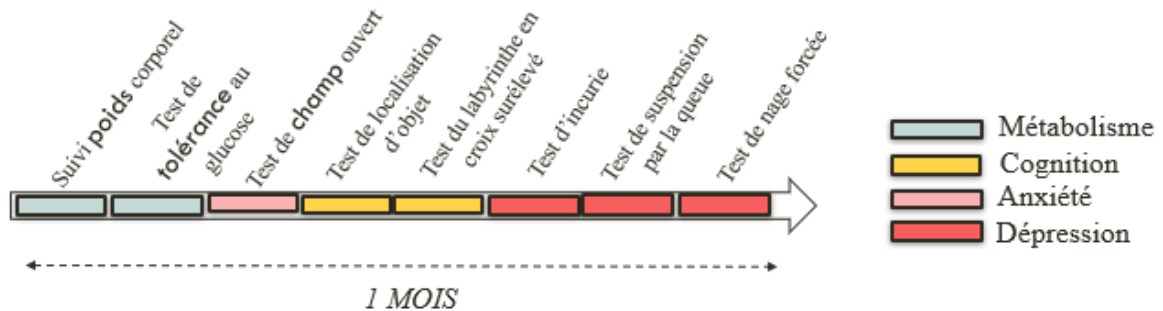


Figure 102: Chronologie des différents tests comportementaux effectués sur les différentes cohortes de souris (analyses métaboliques, tests cognitifs, tests anxiodépressifs) effectués au sein de l'équipe NutriNeuro (Université de Bordeaux)

La metformine a été utilisée comme témoin positif de l'amélioration du métabolisme des souris soumises au régime hypercalorique enrichi en gras (Zemdegs et al. 2019). L'administration de cet antidiabétique de référence (médicament le plus utilisé dans le traitement du diabète de type 2) aux souris diabétiques présentant des troubles comportementaux, a amélioré sans reverser les altérations métaboliques et émotionnelles induites par le régime HF/HS (données non présentée). Cet effet curatif de la metformine est conforme à la littérature (Guo et al. 2014 ; Fatemi et al. 2019).

La première cohorte de souris a reçu dans l'eau de boisson la fraction **PSB-UR** à une concentration de 200 µg/ml soit 50 mg/kg poids sec. La fraction PSB-UR n'a donné aucun résultat concluant sur le métabolisme et le comportement des modèles murins. De ce fait, la seconde cohorte a reçu en supplémentation les fraction **PROT2-UR** (100 µg/ml soit 19 mg/kg poids sec) et **P-UR** (10 µg/ml soit 1,2 mg/kg poids sec), qui ont été ajoutées en plus de la fraction **PSB-UR** à partir de la 13^{ème} semaine.

Analyse des paramètres métaboliques

Dans un premier temps, la tolérance au glucose et le poids ont été suivie en continu durant les 16 semaines de traitement avec les différentes fractions. La *figure 103* présente le suivi de poids obtenue pour les différents groupes de souris. Il faut noter que les **souris sous régime high fat ont un poids corporel plus élevé** que celui des souris sous régime standard et que cette différence de poids augmente avec le temps. Les souris traitées avec les trois fractions issues d'*U. rigida* n'ont pas présenté de différence significative de poids corporel comparées aux souris non traitées (*figure 103*).

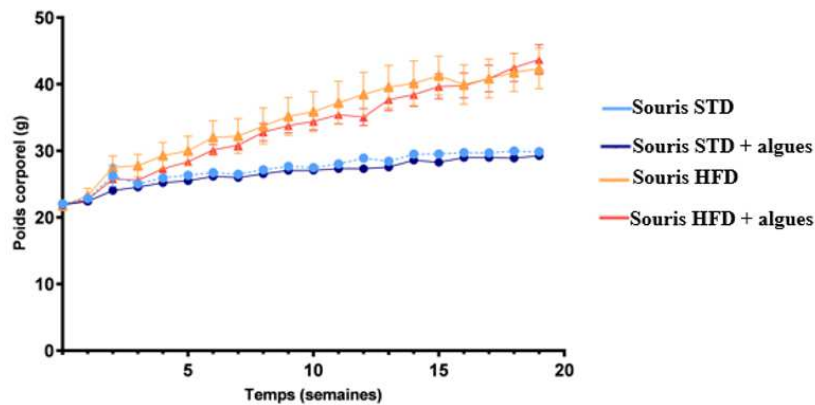


Figure 103: Suivi de la masse corporelle obtenue pour les 4 groupes de modèles murins (Souris STD, Souris STD + algues, Souris HFD et Souris HFD + algues)

La *figure 104* présente la cinétique de la glycémie postprandiale obtenue pour les différents groupes de souris. Les groupes Souris STD et les souris STD + algues présentent le même profil de cinétique glycémique. Les **souris sous régime riche en graisse** montrent quant à elles une **glycémie très significativement plus élevée** que celles sous régime standard, passant de 300 mg/dl de glycémie à près de 600 mg/dl après 60 min. Enfin, les souris sous régime riche en graisse traitées avec les fractions P-UR, PROT2-UR et PSB-UR affichent une glycémie très significativement plus forte que les souris non traitées, de l'ordre de 500 mg/dl après 60 min.

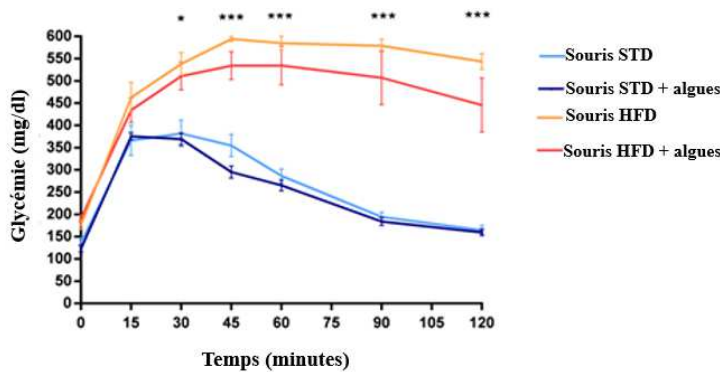


Figure 104: Cinétique de la glycémie obtenues pour les 4 cohortes de modèles murins (Souris STD, Souris STD + algues, Souris HFD et Souris HFD + algues). Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) and *** ($p < 0,001$).

Ces résultats sont confirmés via le calcul de l'aire sous la courbe des cinétiques de glycémie présentées *figure 105*. Les souris sous régime riche en graisse ont une glycémie très significativement plus élevée que celles sous régime standard. Le régime supplémenté en fractions algales diminue significativement l'aire sous la courbe obtenue pour les souris sous régime high fat, d'environ 26%.

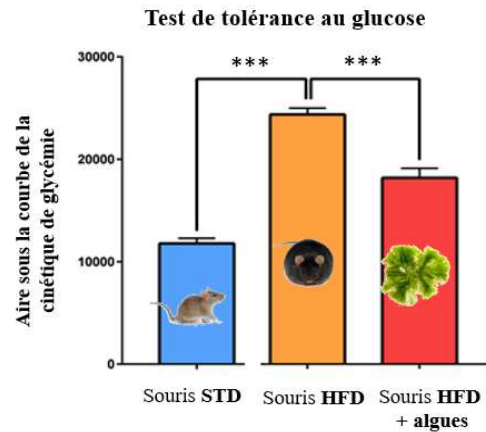


Figure 105: Aire sous la courbe de cinétique de glycémie postprandiale obtenue pour les 3 groupes de modèles murins (Souris STD, Souris HFD et Souris HFD + algues) lors du test de tolérance au glucose. Les différences significatives entre les valeurs obtenues et celles des conditions contrôles sont indiquées par * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) and *** ($p < 0,001$).

Nous pouvons donc en conclure que le régime riche en graisse altère l'homéostasie glucidique et que la supplémentation avec les fractions algales améliore très significativement l'homéostasie glucidique.

Analyses comportementales

Dans un premier temps, l'évaluation de la **cognition** des groupes de souris, plus particulièrement au travers du test de localisation d'objet, a révélé un effet très bénéfique des fractions algales (*figure 106*).

Ce test permet de déterminer la performance de reconnaissance spatiale des souris en mesurant le temps passé avec un objet déplacé par rapport au temps passé avec le second objet non déplacé lors de la phase de restitution, 1 h après la phase d'acquisition. Le ratio du temps passé avec l'objet déplacé doit être supérieur à 50% pour affirmer que la reconnaissance spatiale de la souris est effective. Selon les résultats de ce test, le **régime riche en graisse** a tendance à induire **une altération de la mémoire** car ce ratio passe de plus de 60% pour le groupe de souris témoins (STD) à moins de 40% pour le groupe de souris high fat (HFD). Au contraire, le groupe de souris soumis à la supplémentation en fractions **P-UR, PROT2-UR et PSB-UR (HFD + algue)** montre un ratio de près de 70%, significativement bien plus important que celui du groupe high fat ($p = 0,053$), ce qui prouve que la supplémentation permet d'améliorer nettement la mémoire spatiale des souris high fat.

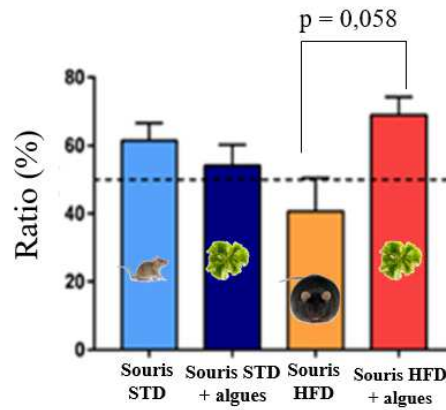


Figure 106: Ratio du temps passé entre l'objet déplacé et l'objet non déplacé lors du test de localisation d'objets appliqué aux différents groupes de souris (Souris STD, Souris STD + algues, Souris HFD et Souris HFD + algues). Test t de Student non apparié, utilisation de GraphPad Prism (Logiciel GraphPad).

Dans un deuxième temps, les **comportement anxieux et dépressif** des groupes de souris ont été évalués. Le **régime riche en graisse** a tendance à induire **un phénotype anxieux**. La supplémentation algale n'a montré, du point de vue du phénotype anxieux, aucun effet positif (données non présentées). En revanche, leur **comportement pseudo-dépressif**, analysé via un test d'incurie (figure 107), qui évalue le temps total consacré au toilettage par les souris, 5 min après les avoir vaporisées avec une solution de saccharose à 10%, a été affecté **positivement**. Ce test a, en effet, démontré comme attendu que **le régime riche en graisse** induit **un phénotype pseudo-dépressif**, caractérisé par un temps consacré au nettoyage des souris high fat d'environ 30 s, beaucoup plus faible que celui des souris contrôles, en fait quasiment deux fois moindre. Il a par ailleurs prouvé que les souris high fat supplémentées en fractions algales consacrent au toilettage le même temps que les souris contrôles, environ 58 s, soit une augmentation très significative, de 48% ($p=0,078$), par rapport aux souris high fat non supplémentées. Ceci indique que les souris sous régime riche en graisse supplémenté avec les fractions algales présentent un comportement beaucoup moins pseudo-dépressif que les souris sous régime high fat non supplémentées.

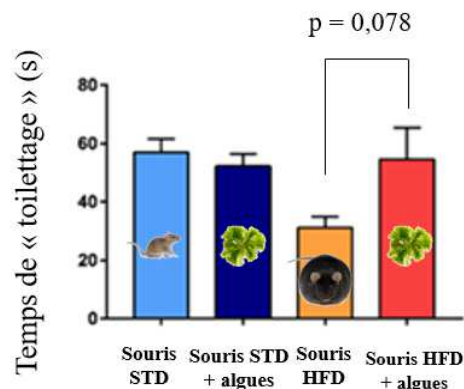


Figure 107: Temps total de toilettage des modèles murins (Souris STD, Souris STD + algues, Souris HFD et Souris HFD + algues). Test t de Student non apparié, utilisation de GraphPad Prism (Logiciel GraphPad).

Conclusions des analyses métaboliques et comportementales

Les souris ayant reçu le régime riche en graisse et en sucre ont vu leur masse corporelle augmenté (p.175). Cette augmentation de la proportion du tissu adipeux peut être associée à une réaction inflammatoire chronique dit à bas bruit. En effet, les adipocytes régulent le métabolisme en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α ou encore l'IL-6 (Tilg et *al.* 2006). Cet état inflammatoire est une des causes de l'inhibition de voie de signalisation à l'insuline, provoquant une résistance à l'insuline comme cela semble être le cas pour les souris ayant reçu le régime riche en graisse (p.176).

La réaction inflammatoire induite va impacter l'ensemble de l'organisme par l'intermédiaire des cytokines libérées dans la circulation sanguine qui vont agir à distance sur différents organes, dont le cerveau. Il existe de nombreuses voies de signalisation et de communication permettant la transmission de l'inflammation du système nerveux périphérique vers le système nerveux central. L'activation des cellules microgliales et des astrocytes ainsi que la libération de facteurs inflammatoires provoque une neuroinflammation. Cette activation anormale de ces cellules peut être reliée à des troubles anxio-dépressifs et cognitifs. L'obésité peut donc indirectement être corrélée à des déficits cognitifs comme l'attention, les fonctions exécutives et la mémoire (Alosco et *al.* 2014). Des études ont permis de mettre en évidence l'impact d'un régime hyperlipidique et hyperglycémique sur les capacités cognitives et contribuer à l'altération de la régulation du glucose, facteur important de déclin cognitif associé au diabète de type 2 (Winocur et *al.* 2005). Nos résultats tendent vers ceux retrouvés dans la littérature. En effet, les souris ayant reçu le régime riche en graisse et en sucre ont tendance à développer un phénotype anxieux et pseudo-dépressif

La supplémentation alimentaire en **P-UR**, **PROT2-UR** et **PSB-UR** permet d'**améliorer** significativement l'**homéostasie glucidique** altérée des souris soumises au régime riche en graisse, ainsi que leurs **capacités de cognition, relatives à la mémoire spatiale**. Elle permet par ailleurs de **diminuer nettement leur comportement pseudo-dépressif**, les replaçant dans un état proche des souris sous régime alimentaire normal. Il sera pour autant essentiel de confirmer ces résultats, au travers d'une nouvelle étude portant sur une seconde cohorte de souris, qui est actuellement en cours. Etant donné que les 3 fractions retenues ont été associées dans ce travail, il sera également nécessaire de déterminer quelle(s) fraction(s) est ou sont à l'origine des activités pro-cognitives et antidépressives mises en évidence, en association ou non. Il semble peu probable que **PSB-UR**, unique fraction à avoir été appliquée seule en supplémentation, soit à l'origine des activités, hors action synergique avec une ou les 2 autres fractions, puisqu'elle n'a donné aucun résultat bénéfique lorsqu'elle était la seule source de supplémentation. Cui et *al.* (2012) ont montré le potentiel de polysaccharidiques sulfatés, les fucoidanes (7000 Da), à améliorer les déficits comportementaux et cognitifs de rats et à inhiber la libération de ROS et de TNF- α . Autre exemple, il a été démontré qu'un extrait d'*Ulva* sp. (40 mg/kg pc), contenant des polysaccharides sulfatés, induit une réduction de l'immobilité chez le rat. Cet extrait, contenant 45% d'ulvanes montre des résultats similaires à celui d'un antidépresseur connu (Violle et *al.* 2017). Les fractions **P-UR**, **PROT2-UR** et **PSB-UR** semblent induire des effets similaires associés à une régulation de l'homéostasie glucidique à des concentrations plus faibles. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'amélioration du

comportement des souris pourrait être due à la synergie de la fraction **PSB-UR** contenant des ulvanes et les autres fractions. En effet, la fraction **PSB-UR** administrée seule n'a pas démontré d'amélioration du comportement chez les modèles murins. On peut conclure que ces ulvanes doivent être associés à d'autres biomolécules afin d'améliorer les paramètres comportementaux. Néanmoins, la fraction **P-UR** a démontré des propriétés anti-inflammatoires en diminuant la concentration de NO dans les surnageants cellulaires. Ces résultats ont été confirmés par la diminution de l'expression génique de l'iNOS. Comme vu précédemment, de nombreuses études ont établi le lien entre l'inflammation, et indirectement la neuroinflammation, induit par les régimes riches en graisse et en sucre et les profils anxiodépressifs. Il a été démontré que l'extrait méthanolique d'*Ulva conglobata* supprimait l'expression de l'enzyme pro-inflammatoire cyclooxygénase-2 (Cox-2) et de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) dans la microglie murine BV2 réduisant l'inflammation au niveau cérébrale (Jin et *al.* 2006). Nous pouvons émettre l'hypothèse que la fraction **P-UR** induit une diminution de l'inflammation, et indirectement la neuroinflammation, due au régime high fat améliorant, au cours du temps, le profil pseudo-dépressif des modèles murins. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer le mécanisme d'action associé à ces effets biologiques.

Bien que préliminaires et nécessitant encore d'être confirmés, ces résultats *in vitro* et *in vivo* indiquent qu'une supplémentation nutritionnelle en actifs extraits d'*U. rigida* (assimilables par l'organisme) peut cibler les mécanismes physiopathologiques des troubles métaboliques, cognitifs et émotionnels. Les activités biologiques mises en évidence grâce aux précédents travaux ont été résumé dans le schéma ci-dessous (*figure 108*).

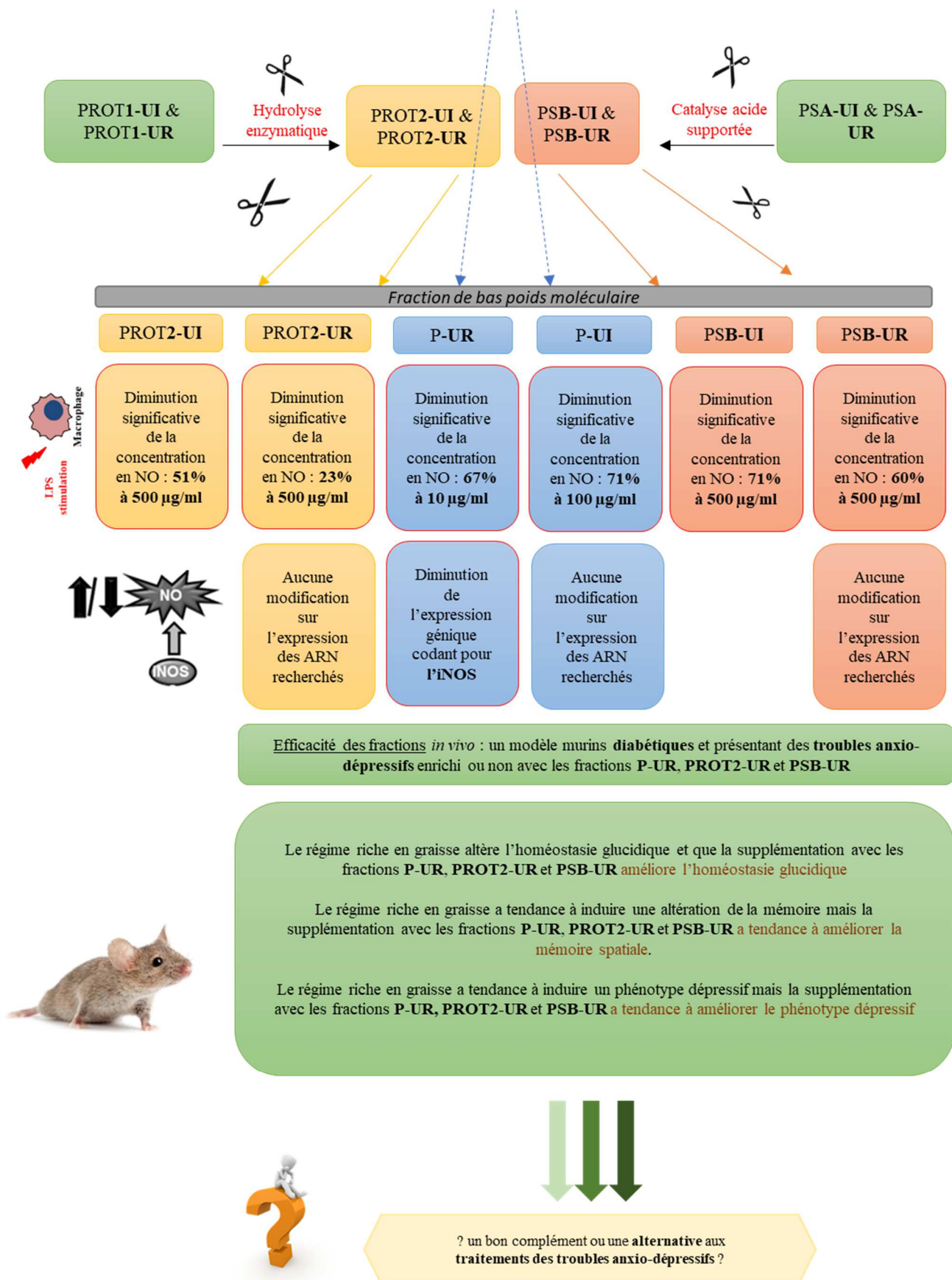


Figure 108 : Schéma récapitulatif des activités anti-inflammatoires pour les fractions de bas poids moléculaires

V. Conclusion Générale et perspectives

L'objectif majeur de cette thèse était d'identifier des applications potentiellement commercialisables pour les différentes fractions de macroalgues marines extraites et purifiées au moyen du procédé SEPROSYS[®], et en particulier la fraction protéique. Tout cela en ciblant des activités appartenant aux domaines de la nutraceutique et de la dermo-cosmétique, pour lesquels les molécules sont à moyenne valeur ajoutée et où le risque économique est plus faible et le retour sur investissement plus rapide que la pharmaceutique, afin de pérenniser le procédé et l'entreprise. Ces travaux de thèse ont permis :

- a) d'optimiser les étapes de broyage et de clarification du procédé SEPROSYS[®] afin d'améliorer les rendements massiques des fractions contenant les protéines (**PROT1**) et les polysaccharides (**PSA**), et d'adapter le procédé à l'échelle semi-industrielle ;
- b) de caractériser et de développer nos connaissances sur la **composition biochimique** et **structurale** des fractions **PROT1** provenant d'*Ulva rigida* et d'*Ulva intestinalis* ;
- c) d'adapter une méthode d'hydrolyse de ces fractions **PROT1** par voie enzymatique, facilement transposable et déjà utilisée à l'échelle industrielle ;
- d) d'identifier une **activité anti-âge** pour différentes fractions provenant d'*Ulva rigida* et *Ulva intestinalis*, permettant d'imaginer une valorisation industrielle de ces fractions et de confirmer la nature protéique de la biomolécule à l'origine de l'activité.
- e) d'identifier une **activité anti-tâche** pour différentes fractions provenant d'*Ulva rigida* et *Ulva intestinalis*, permettant d'envisager une **perspective de développement** pour ces fractions :
- f) D'identifier le potentiel **anti-inflammatoire** de fractions contenant des **biomolécules de bas poids moléculaire** aboutissant à des effets concluants à l'échelle *in vivo*.

<p><u>Partie I</u> : Procédé de fractionnement et de purification de biomolécules issues de macroalgues vertes.</p>
--

La partie I de ces travaux de thèse a porté sur la production d'extraits de macroalgues vertes. Ces fractions, issues d'*U. rigida* et *U. intestinalis*, correspondaient à l'extrait aqueux (**EA-UR** / **EA-UI**), au rétentat (**R-UR** / **R-UI**), au perméat (**P-UR** / **P-UI**), à la fraction protéique (**PROT1-UR** / **PROT1-UI**) et à la fraction polysaccharidique (**PSA-UR** / **PSA-UI**)

Dans un premier temps, les étapes de broyage et de clarification des différentes fractions provenant du procédé SEPROSYS[®] ont été optimisées afin d'améliorer le rendement massique d'obtention des fractions protéiques (**PROT1**) et des fractions polysaccharidiques (**PSA**). Les étapes de broyage ont été optimisées afin de dégrader les parois algales grâce à l'utilisation d'un broyeur industriel. La granulométrie des particules a donc été diminuée afin d'augmenter la surface d'échange lors de l'extraction, et la possibilité de libérer les polymères intra-cellulaires, tels que la Rubisco, l'ATP synthase ou en l'actine. Les étapes de clarification ont été optimisées afin d'éliminer les débris cellulaires générés lors du broyage. En effet, après filtration grossière à l'aide d'un cône de filtration, une étape de filtration sur un tamis de 30 microns et un passage

sur un filtre à plaque de 1,2 microns et de 0,8 microns ont été ajoutés. Grâce à ces optimisations, les rendements massiques ont été multipliés **par 3,4** avec un rendement de 16 % pour la fraction **PSA-UR**, de 2,2% pour la fraction **PROT1-UR**, de 7,8% pour la fraction **PSA-UI** et de 4,2% pour la fraction **PROT1-UI**. De plus, l'optimisation du procédé a permis le passage à une échelle semi-industrielle permettant de traiter une dizaine de kilos de biomasse.

Après avoir déterminé la composition biochimique des différentes fractions, les fractions **PROT1-UR** et **PROT1-UI**, composées de **52%** et **51%** de protéines, ont été caractérisées. La fraction **PROT1-UR** contenait une population protéique ayant un PM **supérieur à 669 kDa**, une population protéique allant de **30 à 3 kDa** et ayant un PM majoritaire de **15 kDa** et une population peptidique ayant un PM **inférieur à 2 kDa**. Elle comportait **85%** de protéines présentant un PM **supérieur à 50 kDa**, associées à de faibles proportions de protéines de PM compris entre 10 et 50 kDa (**6%**) et inférieur à 3 kDa (**20%**). Cette fraction était majoritairement composée de **leucine** (21,2%), d'**isoleucine** (16,8%), de **proline** (12,3%), de **phénylalanine** (14,5%), de **tyrosine** (5,5%) et de **valine** (20,9%). La fraction **PROT1-UI** contenait, elle, une population protéique ayant un PM **supérieur à 669 kDa** et une population protéique allant de **60 à 3 kDa** et ayant un PM majoritaire de 22 kDa. Elle comportait des protéines de PM compris entre 50 et 10 kDa (**85%**), seulement une faible proportion de protéines de PM supérieur à 50 kDa (**36%**) et une proportion de protéines et peptides ayant un PM inférieur à 10 kDa (**15%**). Cette fraction était majoritairement composé de **leucine** (27,2%), d'**isoleucine** (23,3%), de **proline** (5,2%), de **phénylalanine** (6,9%), et de **valine** (28,4%). Les fractions protéiques ont été hydrolysées par voie enzymatique à l'aide d'un cocktail de protéases, Flavourzyme®.

Deux fractions de bas poids moléculaires ont été obtenues, **PROT2-UR** et **PROT2-UI**. La fraction **PROT2-UR (H-PROT1-UR_{2h})** contenait **11%** de protéines avec un poids moléculaire inférieur à 50 kDa et **38%** de peptides ayant un poids moléculaire inférieur à 3 kDa. Elle comportait 53 peptides identifiés. Les acides aminés majoritaires composant ces différents peptides étaient la leucine ou/et isoleucine (14,8%), la valine (14,1%), la proline (13,4%) et l'acide glutamique (10,7%). La fraction **PROT2-UI (H-PROT1-UI_{1h})** contenait **66%** de protéines avec un PM inférieur à 50 kDa et **37%** de peptides ayant un PM inférieur à 3 kDa. 83 peptides ont été identifiés et étaient majoritairement composés de leucine ou/et isoleucine (17,1%) et d'alanine (9,7%). D'autres acides aminés ont été retrouvés en proportions égales : la glycine (7,6%), l'acide glutamique (7,6%), l'acide aspartique (7,9%), la tyrosine (7,4%), la thréonine (7,9%) et la sérine (7,1%).

Les fractions polysaccharidiques ont, elles aussi, été dépolymérisées afin d'obtenir des fractions de bas PM, après 24 h d'hydrolyse acide supportée. La fraction **PSA-UR**, de PM moyen de **56 kDa**, a ainsi pu être réduite à environ **4 kDa**, au sein d'une nouvelle fraction dénommée PSB-UR avec un indice de polydispersité de **2,8**. La fraction **PSA-UI**, de PM moyen de **61 kDa**, a été réduite à environ **3 kDa** donnant la fraction PSB-UI possédant un indice de polydispersité de **2,8**.

Le procédé SEPROSYS® a donc permis d'obtenir différentes fractions de compositions variées, avec des degrés de pureté différents en fonction de l'avancée dans le procédé, contenant

des protéines intracellulaires et des polysaccharides de tailles variées et pouvant donc être valorisables et commercialisables en fonction des activités démontrées.

Partie II : Fractions provenant de macroalgues vertes, remède anti-âge et anti-tâche

Une étude réalisée sur le marché dermocosmétique a annoncé un chiffre d'affaires de l'ordre de 638 milliards d'euros pour l'industrie cosmétique (source Grand View Research, 2019). La forte croissance de ce marché et la demande grandissante des consommateurs pour des produits éco-compatibles permet de cibler des applications, comme les activités anti-âge et anti-tâche, rapidement commercialisables pour les différentes fractions provenant d'*Ulva rigida* et *Ulva intestinalis*. Dans la partie II de ces travaux, le potentiel de valorisation en dermocosmétique des différentes fractions, en particulier en termes d'activités anti-âge et anti-tâche, a été évalué.

- **Etude de l'activité pro-collagène et pro-acide hyaluronique**

Dans un premier temps, nous avons évalué l'activité anti-âge des différentes fractions à travers l'évaluation de la production de collagène et d'acide hyaluronique, par deux lignées de fibroblastes dermiques humains normaux : CCD-1059Sk et CCD-1090Sk. Les résultats ont été comparés à deux témoins positifs, l'acide hyaluronique pour l'activité pro-collagène et le TGF- β pour l'activité pro-acide hyaluronique. Nous avons pu démontrer que pour les fractions **EA-UI, R-UI, PROT1-UI, P-UI, EA-UR, R-UR, P-UR** et **PROT1-UR**, la production de collagène et d'acide hyaluronique augmentait de manière dose-réponse significative par rapport au témoin négatif et était supérieure aux témoins positifs. La fraction **R-UI** a particulièrement montré une forte activité pro-collagène avec + **312%** pour la lignée 1059 et + **470%** pour la lignée 1090 ainsi qu'une forte activité pro-hyaluronique avec + **579%** pour la lignée 1059 et + **569%** pour la lignée 1090. Ces résultats ont rendu cette fraction particulièrement intéressante économiquement au vu de son degré d'avancement au sein du procédé SEPROSYS[®]. Par ailleurs, les fractions ont induit une diminution de viabilité cellulaire des deux lignées fibroblastiques, détectée par test MTT, mais aucune mort cellulaire par nécrose, démontrée par test LDH, laissant entendre que la diminution de leur viabilité cellulaire observée est due à un effet cytostatique lié à leur réorientation métabolique en faveur de la biosynthèse de collagène et/ou d'acide hyaluronique, et au détriment de la croissance cellulaire. Aucune altération morphologique caractéristique des fibroblastes n'ayant été observée, l'éventualité d'un effet pro-apoptotique non nécrotique, indétectable via le test LDH, est écartée. Il serait nécessaire toutefois pour le prouver sans ambiguïté de réaliser une analyse d'effet pro-apoptotique directe mais ce test très lourd n'a pu être réalisé faute de temps.

Afin de confirmer que les fractions protéiques étaient à l'origine de l'activité observée, les fractions **PROT1-UI** et **PROT1-UR** ont été hydrolysées par voie enzymatique. Les fractions hydrolysées (**H-PROT1-UI** et **H-PROT1-UR**) provenant de l'hydrolyse enzymatique de **PROT1-UI** et **PROT1-UR** ont été testées. Les hydrolysats **H-PROT1-UR** n'ont pas

modifié l'effet sur la viabilité cellulaire, passant de **56%** à **46%** de viabilité cellulaire à 500 µg/ml, après 24 h de dépolymérisation. En ce qui concerne la lignée cellulaire 1090, l'hydrolyse de la fraction **PROT1-UR** a provoqué une diminution de la viabilité cellulaire passant de **111%** à **52%** après 24 h. La fraction **PROT1-UI** à 500 µg/mL a quant à elle réduit de **42%** la prolifération de la lignée cellulaire 1059 et de **49%** la prolifération de la lignée 1090. L'effet des fractions **H-PROT1-UI** (t_{2h} , t_{4h} , t_{6h} et t_{24h}) sur la prolifération des fibroblastes était différente par rapport à celui de **PROT1-UI**. La fraction **H-PROT1-t_{24h}** a augmenté la viabilité de **79%** pour la lignée cellulaire 1059 et **78%** pour la lignée cellulaire 1090.

L'hydrolyse enzymatique de **PROT1-UI** a provoqué une diminution nette de la production de collagène et de l'acide hyaluronique au cours de l'hydrolyse et cela, pour les deux lignées cellulaires. Ces résultats ont permis d'attester d'une relation entre la diminution du poids moléculaire des composés protéiques ou/et polypeptidiques présents dans cette fraction et la diminution des activités pro-collagène et pro-hyaluronique de la fraction, laissant supposer une éventuelle relation structure-fonction. En revanche, la réponse cellulaire a différé pour la fraction **PROT1-UR** et ses hydrolysats **H-PROT1-UR**. En effet, si l'hydrolyse a diminué de façon dose-réponse significative la production d'acide hyaluronique, elle a provoqué une augmentation dose-dépendante de la production de collagène pour **la lignée cellulaire 1090**, passant de + 25% (**PROT1-UR**) à + 270 % (**H-PROT1-UR_{t24h}**) à 500 µg/ml. La diminution de la viabilité fibroblastique a pu s'expliquer par une éventuelle réorientation métabolique afin de produire une forte quantité de collagène. L'hydrolyse protéique de la fraction **PROT1-UR** a donc généré un composé protéique ou peptidique possédant une activité pro-collagène.

Nous avons donc fait l'hypothèse que la diminution des activités pro-collagène et pro-acide hyaluronique pouvait être corrélée avec la disparition de la population protéique à 23 kDa et celle ayant un PM supérieur à 400 kDa pour la fraction **PROT1-UI**. Et concernant la fraction **PROT1-UR**, la réduction de l'activité pro-acide hyaluronique pouvait être corrélée avec la disparition de la population protéique ayant un PM supérieur à 400 kDa et l'augmentation de l'activité pro-collagène reliée à l'apparition et au maintien de la population protéique aux alentours de 20 kDa.

- **Etude de l'activité anti-tâche**

Dans un second temps, nous avons évalué le potentiel anti-tâche des fractions issues d'*U. rigida* et *U. intestinalis* correspondant à l'extrait aqueux (**EA-UR / EA-UI**), au rétentat (**R-UR / R-UI**), au perméat (**P-UR / P-UI**), à la fraction protéique (**PROT1-UR / PROT1-UI**) et à la fraction polysaccharidique (**PSA-UR / PSA-UI**). Nous avons tout d'abord démontré que les différentes fractions n'impactaient pas la viabilité cellulaire des **mélanocytes B16F0**. Les différentes fractions ont induit une diminution significative dose-dépendante de la biosynthèse de mélanine en présence de l'hormone mélanotrope (α -MSH). La fraction **PSA-UI** a montré une activité supérieure à celle du témoin positif, **l'acide kojique** permettant de descendre en dessous du niveau basal de mélanine intracellulaire. Elle a induit une diminution de **71%** à 500

$\mu\text{g/ml}$ alors que l'acide kojique a permis une diminution de **51%** à même concentration. De même, concernant la fraction **PROT1-UR**, elle a induit une diminution de **67%** de la biosynthèse de mélanine. Nous avons émis l'hypothèse que les polysaccharides sulfatés de type ulvanes étaient susceptibles de porter l'activité inhibant la biosynthèse de mélanine chez *Ulva intestinalis*, mais que l'activité était plutôt portée par les protéines concernant *Ulva rigida*.

Nous avons ensuite corrélié ces résultats avec l'effet des différentes fractions sur la sécrétion de la mélanine dans le surnageant cellulaire. Les fractions provenant de l'extraction d'*Ulva intestinalis* et d'*Ulva rigida* ont induit une diminution significative, dose-dépendante, et concordante avec celle obtenue lors du dosage intracellulaire. A contrario du dosage intracellulaire, la fraction **P-UR** a impacté la sécrétion de mélanine avec une diminution de **41% à 500 $\mu\text{g/ml}$** et a montré une activité différente des autres fractions.

Ces résultats nous ont semblé particulièrement intéressants puisqu'ils ont permis de valoriser les fractions issues d'*U. rigida* et *U. intestinalis* en mettant en avant le double potentiel dermocosmétique (anti-âge et anti-tâche) de ces fractions.

Une étude de marché a été réalisée par la société **Parfum Marketing** sur les actifs disponibles sur le marché ciblant les mêmes activités fonctionnelles que celles mises en évidence lors de ces travaux. Il en ressort que les fractions ont une activité *in vitro* systématiquement supérieure ou équivalente aux produits commercialisés aujourd'hui. Le marché des cosmétiques a besoin d'un renouvellement régulier des produits pour maintenir une activité marketing forte des leaders du marché. La société SEPROSYS a pu identifier près d'une centaine d'actifs disponibles sur le marché français qui visent les mêmes revendications anti-âge que les fractions issues du procédé SEPROSYS[®], c'est-à-dire une ressource naturelle avec une production maîtrisée, un procédé d'extraction biologique répondant à des clients à la recherche de produits éthiques et naturels. Ainsi pour pouvoir envisager une croissance pérenne de l'entreprise, la production d'actif pour la cosmétique paraît être un relais prometteur pour la société SEPROSYS. Sur un marché français identifié de 130 à 450 m€ et une part de marché de 0,2%, le chiffre d'affaire minimum serait de l'ordre de 260 k€, soit pour un prix de vente moyen du marché de 300 €/kg une production annuelle de 780 kg.

Partie III : Etude du potentiel anti-inflammatoire de fractions issues d'*Ulva* sp. en vue de développer un actif ciblant les troubles cognitifs et anxio-dépressifs

Dans la partie III de ces travaux, nous avons évalué le potentiel anti-inflammatoire des fractions P-UR et P-UI, PROT2-UR et PROT2-UI ainsi que **PSB-UR** et **PSB-UI**. Pour cela, nous avons utilisé une lignée de **macrophages murins RAW 264.7**.

Ces fractions n'ont pas induit d'effets négatifs sur la viabilité cellulaire des macrophages. Au contraire, elles semblaient induire une augmentation de la prolifération cellulaire de 47% (**P-UI**), de 57% (**P-UR**) à 10 $\mu\text{g/ml}$, de 50% (**PROT2-UI**) et 18% (**PROT2-UR**) à 500 $\mu\text{g/ml}$, tout comme **PSB-UI** et **PSB-UR** avec une augmentation de 25% et de 53% à 500 $\mu\text{g/ml}$.

Le potentiel anti-inflammatoire a ensuite été évalué en mesurant la production de monoxyde d'azote par les mêmes macrophages murins stimulés au LPS. Les fractions **P-UI**, **PROT2-UI** et **PSB-UI** ont induit respectivement une diminution significative de la concentration en NO de 71% à 100 µg/ml, de 71% à 500 µg/ml et de 51% à 500 µg/ml. Des observations similaires ont été faites pour les fractions issues d'*U. rigida*. **P-UR**, **PROT2-UR** et **PSB-UR** ont, elles aussi, induit respectivement une diminution significative de la concentration en NO de 67% à 10 µg/ml, de 23% à 500 µg/ml et de 60% à 500 µg/ml.

Afin d'appuyer ces résultats, nous avons réalisé des analyses transcriptomiques. Les niveaux d'expression de l'IL-6, du facteur TNF- α , de COX-2, de l'IFN- β , l'IL-1 β , de l'iNOS, de l'IL-10 et du facteur TGF- β ont été évalués. Les profils d'expression génétique obtenus en présence des fractions **PSB-UR**, **PROT2-UR** et **P-UI** étaient similaires à celui des cellules traitées au LPS, indiquant que ces fractions n'impactaient pas l'expression des gènes sélectionnés. En revanche, concernant la fraction **P-UR**, celle-ci a induit une diminution significative de l'expression du gène codant pour l'iNOS passant d'un fold change de 7 à 2.

Ces résultats sont particulièrement intéressants puisqu'ils ont été obtenus avec des biomolécules non purifiées, et ont montré des activités supérieures aux témoins positifs. Au vu de ces résultats, les différentes fractions ont été testées à l'échelle *in vivo* dans le but d'évaluer leur potentiel applicatif en tant que supplémentation nutraceutique. Lors de ces tests *in vivo* effectués au sein de l'équipe NutriNeuro de l'INRA de Bordeaux, nous avons utilisé un modèle de souris diabétiques et présentant des troubles anxio-dépressifs dus à la consommation d'un régime hypercalorique enrichi en gras (régime HFD), enrichi ou non avec les fractions **P-UR**, **PROT2-UR** et **PSB-UR**. Le métabolisme énergétique (sensibilité à l'insuline et tolérance au glucose) et les comportements de type anxio-dépressifs des animaux ont été évalués. Une cohorte de souris a reçu en supplémentation les **fraction PROT2-UR** (100 µg/ml) et **P-UR** (10 µg/ml). Elles ont été ajoutées en plus de la fraction **PSB-UR** (200 µg/ml).

Les souris sous régime riche en graisse traitées avec les fractions **PSB-UR**, **PROT1-UR** et **P-UR** ont présenté une glycémie significativement plus faible que celles non traitées avec ces fractions, passant de **600 mg/dl** à **500 mg/dl** au bout de **60 min**. Nous en avons conclu que la supplémentation améliore l'homéostasie glucidique. Concernant les tests de cognition, la supplémentation avait tendance à améliorer la mémoire spatiale. Concernant les tests d'évaluation du comportement dépressif, le régime riche en graisse avait tendance à induire un phénotype dépressif mais la supplémentation a permis d'atténuer ce phénotype dépressif.

La supplémentation en **PSB-UR**, **PROT1-UR** et **P-UR** a donc permis d'améliorer significativement l'homéostasie glucidique des souris altérée par un régime riche en graisse et d'améliorer la cognition et le comportement pseudo-dépressif des souris. La fraction **P-UR** a démontré des propriétés anti-inflammatoires qui ont été confirmées par la diminution de l'expression génétique de l'iNOS. De nombreuses études ont établi le lien entre l'inflammation induite par les régimes riches en graisse et en sucre et les profils dépressifs. Nous avons donc émis l'hypothèse que la fraction **P-UR** induisait une diminution de l'inflammation due au régime high fat, atténuant au cours du temps le profil pseudo-dépressif des modèles murins.

Perspectives envisagées :

Ces travaux nous ont permis d'optimiser et d'adapter le procédé SEPROSYS® à l'échelle semi-industrielle. Il serait intéressant, par la suite, de développer le procédé à **l'échelle industrielle** afin d'extraire à partir de 100 kg de biomasse algale. En effet, l'outil de production dans lequel la société souhaite investir pourra permettre de produire un actif à un rythme de 80 kg par semaine, soit un objectif de taux d'utilisation minimal de 10 semaines par an. En parallèle, la société Seprosys souhaite proposer une offre technologique unique de production utilisable directement chez le producteur de la matière première végétale. L'investissement prévu dans l'outil de production est de 434 k€. L'objectif à 5 ans est un chiffre d'affaire pour cette activité de 300 à 500 k€, permettant une croissance de la société de l'ordre de 30%.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence **deux domaines de valorisation potentiels** et plus particulièrement trois types d'activités, pour l'ensemble des fractions issues du procédé d'extraction et de fractionnement SEPROSYS® à partir des macroalgues vertes *Ulva rigida* et *Ulva intestinalis* provenant respectivement de la ferme du Douhet sur l'île d'Oléron et de la société Algorythme sur l'île de Ré.

Le premier domaine d'application est **le domaine dermocosmétique**. Dans un premier temps, nous avons démontré **l'activité anti-âge** de nos fractions avec la mise en évidence de l'origine protéique de cette activité. Il serait intéressant de confirmer ces résultats à l'aide d'analyses transcriptomiques, afin d'évaluer l'expression des gènes intervenant dans la production de collagène et d'acide hyaluronique, mais aussi de mettre en évidence le mécanisme d'action mis en jeu.

De plus, de légères différences ont été mises en avant concernant les deux lignées fibroblastiques. Les fractions pourraient, par exemple, **réguler des voies de biosynthèse du collagène différentes**. La régulation de la biosynthèse du collagène est liée à des voies de transduction impliquant des **cascades de phosphorylations et déphosphorylations** : la voie des protéines SMADs, la voie ERK (extracellular signal regulated kinase) et la voie p38MAPK (mitogen-activated protein kinase). L'activation de ces voies stimule la migration des fibroblastes, ainsi que leur prolifération ou leur différenciation (Jin *et al.* 2012 ; Lee *et al.* 2000 ; Wang *et al.* 1999). Or il a été décrit qu'il existait des différences entre des lignées cellulaires fibroblastiques provenant d'une peau jeune et d'une peau âgée comme la capacité de migration, la sécrétion de métalloprotéases matricielles (MMP) et l'attachement aux matrices (Reed *et al.* 2001). Il serait intéressant de déterminer à quels niveaux les différentes fractions vont induire une différence de réponse métabolique entre les deux lignées cellulaires.

Les résultats obtenus sont donc aussi intéressante d'un point de vue économique puisque les deux lignées cellulaires vont permettre de cibler deux catégories de consommatrices : **peau jeunes** et **peau matures**. En effet, **la lignée fibroblastique 1090Sk** (40 ans) permet de cibler les personnes les plus susceptibles d'acheter des produits anti-âge c'est-à-dire les femmes de plus de 55 ans (Muisse *et al.* 2010). Par ailleurs, il a été démontré que les consommateurs ayant le plus haut pouvoir d'achat, concernant le marché des produits anti-âge sont les femmes âgées

de 50 à 64 ans (Lewis et *al.* 2011). **La lignée fibroblastique 1059Sk** (20 ans), permet, elle, de cibler un marché en hausse, celui des femmes d'une vingtaine d'année souhaitant prévenir l'apparition des rides (Muisse et *al.* 2010). Une enquête réalisée par CACI microlift a montré que l'âge moyen auquel elles commencent à se soucier de l'apparition des rides est de 24 ans (Young. 2014).

Dans un second temps, nous avons démontré **les propriétés anti-tâche** de différentes fractions issues d'*Ulva rigida* et *Ulva intestinalis*. Ces fractions se sont révélées capables de moduler la production mais aussi la sécrétion de mélanine chez des mélanocytes. Il pourrait être envisagé d'évaluer le potentiel inhibiteur de la tyrosinase intracellulaire des différentes fractions et là encore, de vérifier par une analyse transcriptomique l'expression et la transcription des gènes impliqués dans la mélanogénèse.

De plus, il semble indispensable de **formuler en produit fini** les différentes fractions afin de confirmer ces activités dermocosmétiques à l'échelle *in vivo*, sur modèle de peau, ou à l'aide **d'un panel de volontaires** afin d'envisager une potentielle commercialisation des extraits.

Le deuxième domaine d'application mis en évidence est le domaine de la nutraceutique avec une action **anti-inflammatoire** et visiblement des propriétés améliorant significativement **l'homéostasie glucidique, la cognition et le comportement pseudo-dépressif des souris**. Ces résultats sont particulièrement encourageants et il sera essentiel de les confirmer, au travers d'une nouvelle étude portant sur une autre cohorte de souris. Etant donné que les 3 fractions retenues ont été associées dans ce travail, il sera également nécessaire de déterminer quelle(s) fraction(s) est ou sont à l'origine des activités pro-cognitives et antidépressives mises en évidence, en association ou non.

Il serait aussi intéressant de confirmer les analyses transcriptomiques à l'aide d'un western blot afin de mettre précisément en lumière les mécanismes d'action sous-jacents (jeu de phosphorylation des protéines). En effet, après stimulation des macrophages, les protéines NF- κ B cytosoliques sont activées par phosphorylation et transportées dans le noyau où elles induisent la transcription de gènes pro-inflammatoires, incluant iNOS et CXCL2, ainsi que les gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires. De façon générale, la réponse inflammatoire implique des voies de signalisation au niveau cellulaire et lors de l'activation cellulaire, les substrats intracellulaires sont ensuite phosphorylés induisant la transcription et la synthèse de divers médiateurs pro- ou anti-inflammatoires (Carreno. 1999).

VI. Références Bibliographiques

A

- Adrien, A., Baudouin, S., Dufour, D., Bridiau, N., Maugard, T. **2017**. « Pilot production of ulvans from *Ulva* sp. and their effects on hyaluronan and collagen production in cultured dermal fibroblasts ». *Carbohydrate Polymers* 157 : 1306-14.
- Adrien, A., Bonnet, A., Baudouin, S., Dufour, D., Bridiau, N., Maugard, T. **2019**. « Anticoagulant Activity of Sulfated Ulvan Isolated from the Green Macroalgae *Ulva rigida* ». *Marine Drugs* 17 (5).
- Adrien, A. **2016**. « Production pilote de polysaccharides sulfatés issus de macroalgues marines à visée anticoagulante et cosmétique anti-âge ». Thesis, La Rochelle.2016LAROS013.
- Ahn, M.J., Yoon, K.D., Chul Young Kim, So-Young Min, Yong-ung Kim, Hyun Jin Kim, Jeong Ha Kim, et al. **2002**. « Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase and HIV-1 Integrase and Antiviral Activity of Korean Seaweed Extracts ». *Journal of Applied Phycology* 14 (5): 325-29.
- Airanthi, M. K. Widjaja-Adhi, Masashi Hosokawa, Miyashita., K. **2011**. « Comparative Antioxidant Activity of Edible Japanese Brown Seaweeds ». *Journal of Food Science* 76 (1): C104-111.
- Akira, Shizuo, Satoshi Uematsu, et Osamu Takeuchi. **2006**. « Pathogen Recognition and Innate Immunity ». *Cell* 124 (4): 783-801.
- Alghazwi, Mousa, Yen Qi Kan, Wei Zhang, Wei Ping Gai, Mary J. Garson, et Scott Smid. **2016**. « Neuroprotective Activities of Natural Products from Marine Macroalgae during 1999–2015 ». *Journal of Applied Phycology* 28 (6): 3599-3616.
- Alosco, M. L., Gunstad, J. **2014**. « The Negative Effects of Obesity and Poor Glycemic Control on Cognitive Function: A Proposed Model for Possible Mechanisms ». *Current Diabetes Reports* 14 (6): 495.
- Angell, Alex R., Nicholas A. Paul, et Rocky de Nys. **2017**. « A Comparison of Protocols for Isolating and Concentrating Protein from the Green Seaweed *Ulva Ohnoi* ». *Journal of Applied Phycology* 29 (2): 1011-26.
- Ariede, Maíra Bueno, Thalita Marcílio Candido, Ana Lucia Morocho Jacome, Maria Valéria Robles Velasco, João Carlos M. de Carvalho, et André Rolim Baby. **2017**. « Cosmetic Attributes of Algae - A Review ». *Algal Research* 25 : 483-87.
- Arora, N., S. Agarwal, et R.S.R. Murthy. **2012**. « Latest technology advances in cosmaceuticals ». *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* 4 (3): 168-82.
- Athukorala, Y., Lee, K.W., Kim, K.S., Jeon, Y.J. **2007**. « Anticoagulant Activity of Marine Green and Brown Algae Collected from Jeju Island in Korea ». *Bioresource Technology* 98 (9): 1711-16.
- Azam, M. S., Jinkyung Choi, Min-Sup Lee, et Hyeung-Rak Kim. **2017**. « Hypopigmenting Effects of Brown Algae-Derived Phytochemicals: A Review on Molecular Mechanisms ». *Marine Drugs* 15 (10).

B

- Barbarino, E., Lourenço, S.O. **2005**. « An Evaluation of Methods for Extraction and Quantification of Protein from Marine Macro- and Microalgae ». *Journal of Applied Phycology* 17 (5): 447-60.
- Baudouin, S., Dufour, D., Yao, J. **2012**. « Treating Algae by Diffusing Algae in Water, Filtering Pulp, Ultrafiltration of Pressing Juice, Demineralizing Ultrafiltration Retentate and Decanting Demineralized Retentate, and Recovering Vegetable Protein and Sulfated Polysaccharide - Dimensions ». FR-2998894-A1.
- Baumann, H., Gaudie, J. **1994**. « The Acute Phase Response ». *Immunology Today* 15 (2): 74-80.
- Benjama, O., Masniyom, P. **2011**. « Nutritional composition and physicochemical properties of two green seaweeds (*Ulva pertusa* and *U. intestinalis*) from the Pattani Bay in Southern Thailand ». *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 33 (5), 575-583.
- Bentley, R. **2006**. « From Miso, Saké and Shoyu to Cosmetics: A Century of Science for Kojic Acid ». *Natural Product Reports* 23 (6): 1046-62.
- Berri, M., Olivier, M., Holbert, S., Dupont, J., Demais, H., Le Goff, M., Collen, P.N. **2017**. « Ulvan from *Ulva Armoricana* (Chlorophyta) Activates the PI3K/Akt Signalling Pathway via TLR4 to Induce Intestinal Cytokine Production ». *Algal Research* 28 (décembre): 39-47.
- Berthou, J., Migliore-Samour, D., Lifchitz, A., Delettré, J., Floc'h, F., Jollès, P. **1987**. « Immunostimulating Properties and Three-Dimensional Structure of Two Tripeptides from Human and Cow Caseins ». *FEBS Letters* 218 (1): 55-58.
- Bhat, Z. F., Kumar, S., Bhat, H.F. **2015**. « Bioactive Peptides of Animal Origin: A Review ». *Journal of Food*

- Science and Technology* 52 (9): 5377-92.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G., Bodden, M. K., Windsor, L. J., et al. **1993**. « Matrix Metalloproteinases: A Review ». *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists* 4 (2): 197-250.
- Bischof, G. N., et D. C. Park. **2015**. « Obesity and Aging : Consequences for Cognition, Brain Structure, and Brain Function ». *Psychosomatic Medicine* 77 (6): 697-709.
- Bischof, K., G. Kräbs, C. Wiencke, D. Hanelt. **2002**. « Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophyll cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L ». *Planta*. 215 (3). 502-509
- Biziulevicius, G.A., Kislukhina, O.V., Kazlauskaite, J., Zukaite, V. **2006**. « Food-Protein Enzymatic Hydrolysates Possess Both Antimicrobial and Immunostimulatory Activities: A “Cause and Effect” Theory of Bifunctionality ». *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 46 (1): 131-38.
- Blétry, Olivier, Jean-Emmanuel Kahn, Alexandre Somogyi, et Bourgault. 2002. Module 8: Immunopathologie-Réaction inflammatoire. Paris: Editions Masson.
- Bonaccorso, S., Puzella, A., Marino, V., Pasquini, M., Biondi, M., Artini, M., Almerighi, C., et al. **2001**. « Immunotherapy with Interferon-Alpha in Patients Affected by Chronic Hepatitis C Induces an Intercorrelated Stimulation of the Cytokine Network and an Increase in Depressive and Anxiety Symptoms ». *Psychiatry Research* 105 (1-2): 45-55.
- Boubonari, T., Malea, P., Kevrekidis, T. **2008**. « The green seaweed *Ulva rigida* as a bioindicator of metals (Zn, Cu, Pb and Cd) in a low-salinity coastal environment ». *Botanica Marina* 51 (décembre): 472-84.
- Bouloc, A. **2001**. « Les cellules dendritiques cutanées humaines. » M/S. *Médecine sciences*, 2001, Vol. 17, N° 4; p.465-74.
- Brouckaert, P., Libert, C., Everaerd, B., Takahashi, N., Cauwels, A., Fiers, W. **1993**. « Tumor Necrosis Factor, Its Receptors and the Connection with Interleukin 1 and Interleukin 6 ». *Immunobiology* 187 (3): 317-29.
- Brunault, P., Jacobi, D., Miknius, V., Bourbao-Tournois, C., et al. **2012**. « High Preoperative Depression, Phobic Anxiety, and Binge Eating Scores and Low Medium-Term Weight Loss in Sleeve Gastrectomy Obese Patients: A Preliminary Cohort Study ». *Psychosomatics* 53 (4): 363-70.
- Brunt, E. G., Burgess, J. G. **2018**. « The Promise of Marine Molecules as Cosmetic Active Ingredients ». *International Journal of Cosmetic Science* 40 (1): 1-15.
- Buck, B.H. **2017**. « Offshore and Multi-Use Aquaculture with Extractive Species: Seaweeds and Bivalves» *Aquaculture Perspective of Multi-Use Sites in the Open Ocean* : 23-69.
- Burger, P., Landreau, A., Azoulay, S., Michel, T., Fernandez, X. **2016**. « Skin Whitening Cosmetics: Feedback and Challenges in the Development of Natural Skin Lighteners ». *Cosmetics* 3 (4): 36.
- Burnett, C. L., Bergfeld, W.F., Belsito, D. V., Hill, R.A., et al. **2010**. « Final Report of the Safety Assessment of Kojic Acid as Used in Cosmetics ». *International Journal of Toxicology* 29 (6 Suppl): 244S - 73.

C

- Cabanés, J., Chazarra, S., Garcia-Carmona, F. **1994**. « Kojic Acid, a Cosmetic Skin Whitening Agent, Is a Slow-Binding Inhibitor of Catecholase Activity of Tyrosinase ». *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 46 (12): 982-85.
- Callender, V. D. **2004**. « An Open-Label Study of the Use of Adapalene Cream and a Triple-Combination Therapy for the Treatment of Mild-to-Moderate Acne and Post-Inflammatory Hyperpigmentation1 ». *Journal of the American Academy of Dermatology* 50 (3): P169.
- Capuron, L., Ravaut, A., Neveu, P. J., Miller, A. H., Maes, M., R. Dantzer. **2002**. « Association between Decreased Serum Tryptophan Concentrations and Depressive Symptoms in Cancer Patients Undergoing Cytokine Therapy ». *Molecular Psychiatry* 7 (5): 468-73.
- Capuron, L., Castanon, N. **2017**. « Role of Inflammation in the Development of Neuropsychiatric Symptom Domains: Evidence and Mechanisms ». *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 31: 31-44.
- Capuron, L., Dantzer, R. **2003**. « Cytokines and Depression: The Need for a New Paradigm ». *Brain, Behavior, and Immunity* 17 Suppl 1: S119-124.
- Capuron, L., Miller, H. A. **2004**. « Cytokines and Psychopathology: Lessons from Interferon-Alpha ». *Biological Psychiatry* 56 (11): 819-24.
- Carey, M., H., Small, S. L., Yoong, A., Boyes, A., Bisquera, et R., Sanson-Fisher. **2014**. « Prevalence of Comorbid Depression and Obesity in General Practice: A Cross-Sectional Survey ». *The British Journal of General Practice: The Journal of the Royal College of General Practitioners* 64 (620): e122-127.

- Carreno., M.P. **1999**. Signal transduction and inflammation. *La Revue de Médecine Interne*. Vol 20, Is 9, 829-832
- Cassilde, C. **2016**. « Le rôle de l'intestin dans l'équilibre de notre santé ».
- Castanon, N., Luheshi, G., Layé, S. **2015**. « Role of Neuroinflammation in the Emotional and Cognitive Alterations Displayed by Animal Models of Obesity ». *Frontiers in Neuroscience* 9: 229.
- Cavalier-Smith, T. 2004. « Only six kingdoms of life. » *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271 (1545): 1251-62.
- Cha, S.H, S.C., Ko, D., Kim, et Y.J., Jeon. **2011**. « Screening of Marine Algae for Potential Tyrosinase Inhibitor: Those Inhibitors Reduced Tyrosinase Activity and Melanin Synthesis in Zebrafish ». *The Journal of Dermatology* 38 (4): 354-63.
- Chalamaiah, M., B. Dinesh Kumar, R. Hemalatha, T. Jyothirmayi. **2012**. « Fish Protein Hydrolysates: Proximate Composition, Amino Acid Composition, Antioxidant Activities and Applications: A Review ». *Food Chemistry* 135 (4): 3020-38.
- Chalamaiah, M., W., Yu, J., Wu. **2018**. « Immunomodulatory and Anticancer Protein Hydrolysates (Peptides) from Food Proteins: A Review ». *Food Chemistry* 245 (avril): 205-22.
- Chan, Y. Y., K. H. Kim, et S. H. Cheah. **2011**. « Inhibitory Effects of Sargassum Polycystum on Tyrosinase Activity and Melanin Formation in B16F10 Murine Melanoma Cells ». *Journal of Ethnopharmacology* 137 (3): 1183-88.
- Chang, T.S. **2009**. An updated review of tyrosinase inhibitors. *International journal of molecular sciences*, 10(6), 2440-2475.
- Chatter, R., R. Ben Othman, S., Rabhi, M. Kladi, S. Tarhouni, et al. **2011**. « In Vivo and in Vitro Anti-Inflammatory Activity of Neorogioltriol, a New Diterpene Extracted from the Red Algae *Laurencia glandulifera* ». *Marine Drugs* 9 (7): 1293-1306.
- Chen, C.L., S.F. Liou, S.J. Chen, et M.F. Shih. **2011**. « Protective Effects of Chlorella-Derived Peptide on UVB-Induced Production of MMP-1 and Degradation of Procollagen Genes in Human Skin Fibroblasts ». *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP* 60 (1): 112-19.
- Chen, D, X. Wu, Z. Wen. **2008**. « Sulfated polysaccharides and immune response: Promoter or inhibitor? » *Panminerva medica* 50 (juillet): 177-83.
- Chen, P., J. Li, J. Barnes, G. C. Kokkonen, J. C. Lee, Y. Liu. **2002**. « Restraint of Proinflammatory Cytokine Biosynthesis by Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages ». *The Journal of Immunology* 169 (11): 6408-16.
- Cherng, J. Y., C. C. Liu, C. R. Shen, H. H. Lin, et M. F. Shih. **2010**. « Beneficial Effects of Chlorella-11 Peptide on Blocking LPS-Induced Macrophage Activation and Alleviating Thermal Injury-Induced Inflammation in Rats ». *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 23 (3): 811-20.
- Cian, R. E., C. Hernández-Chirlaque, R. Gámez-Belmonte, S. R. Drago, F. Sánchez de Medina, O. Martínez-Augustin. **2018**. « Green Alga *Ulva* spp. Hydrolysates and Their Peptide Fractions Regulate Cytokine Production in Splenic Macrophages and Lymphocytes Involving the TLR4- NFκB/MAPK Pathways ». *Marine Drugs* 16 (7).
- Conceição R., R. Line da, H. Vasconcelos Chaves, D. Rocha do Val, A. Ramos de Freitas, J. Cavalcante Lemos, J. Ariévilto Urgel Rodrigues, et al. **2014**. « A Lectin from the Green Seaweed *Caulerpa Cupressoides* Reduces Mechanical Hyper-Nociception and Inflammation in the Rat Temporomandibular Joint during Zymosan-Induced Arthritis ». *International Immunopharmacology* 21 (1): 34-43.
- Couteau, C., Coiffard., L. **2016**. « Chapter 14 - Seaweed Application in Cosmetics ». *In Seaweed in Health and Disease Prevention*, 423-41. San Diego: Academic Press.
- Couteau, C., et Coiffard., L. **2016**. « Overview of Skin Whitening Agents: Drugs and Cosmetic Products ». *Cosmetics* 3 (3): 27.
- Cui, Y.Q., Y.J. Jia, T. Zhang, Q.B. Zhang, X.M. Wang. **2012**. « Fucoidan Protects against Lipopolysaccharide-Induced Rat Neuronal Damage and Inhibits the Production of Proinflammatory Mediators in Primary Microglia ». *CNS Neuroscience & Therapeutics* 18 (10): 827-33.
- Cumashi, A., N. Ushakova, M. Preobrazhenskaya, A. D'Incecco, A. Piccoli, L. Totani, N. Tinari, et al. **2007**. « A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds ». *Glycobiology* 17 (juin): 541-52.

D

- Dang, H. T., H. J. Lee, E. S. Yoo, P. B. Shinde, Y. M. Lee, et al. **2008**. « Anti-Inflammatory Constituents of the Red Alga *Gracilaria Verrucosa* and Their Synthetic Analogues ». *Journal of Natural Products* 71 (2): 232-40.

- Dantzer, R. **1994**. « How Do Cytokines Say Hello to the Brain? Neural versus Humoral Mediation ». *European Cytokine Network* 5 (3): 271-73.
- Démarchez, M. **2015**. « L'épiderme et la différenciation des kératinocytes ». <https://biologiedelapeau.fr>.
- Desmedt, B., P. Courselle, J. O. De Beer, V. Rogiers, M. Grosber, E. Deconinck, et K. De Paepe. **2016**. « Overview of Skin Whitening Agents with an Insight into the Illegal Cosmetic Market in Europe ». *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 30 (6): 943-50.
- Diamond, C. E., Khameneh, H. J., Brough, D., & Mortellaro, A. **2015**. Novel perspectives on non-canonical inflammasome activation. *ImmunoTargets and therapy*, 4, 131-141.
- Dinareello, C. A. **2011**. « Interleukin-1 in the Pathogenesis and Treatment of Inflammatory Diseases ». *Blood* 117 (14): 3720-32.
- Dinel, A.L, André., C., Aubert., A., Ferreira., G., Layé., S., Castanon., N. **2011**. « Cognitive and Emotional Alterations Are Related to Hippocampal Inflammation in a Mouse Model of Metabolic Syndrome ». *PLoS ONE* 6 (9).
- Dodson, J. R., Aronson., J. M. **2009**. « Cell Wall Composition of *Enteromorpha intestinalis* ». *Botanica Marina* 21 (4): 241-246.
- Du, X, A Poltorak, M Silva, et B Beutler. **1999**. « Analysis of Tlr4-Mediated LPS Signal Transduction in Macrophages by Mutational Modification of the Receptor ». *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 25 (6): 328-38.
- Dubois, M., K. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, et F. Smith. **1951**. « A Colorimetric Method for the Determination of Sugars ». *Nature* 168 (4265): 167.
- Działo, M., J. Mierziak, U. Korzun, M. Preisner, J. Szopa, A. Kulma. **2016**. « The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders ». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (2): 160.

E

- Ek, M., M. Kurosawa, T. Lundeberg, et A. Ericsson. **1998**. « Activation of Vagal Afferents after Intravenous Injection of Interleukin-1beta: Role of Endogenous Prostaglandins ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (22): 9471-79.
- Essakalli, M., O. Atouf, N. Bennani, N. Benseffaj, S. Ouadghiri, et C. Brick. **2009**. « Toll-like récepteurs ». *Pathologie Biologie* 57 (5): 430-38.

F

- Faller, H., M. Botineau. **2011**. Les applications et la toxicité des algues marines. S.C.D. de l'Université de Limoges.
- Faria, A. M. C., A. C.B Gomes-Santos, J. Lauer Goncalves, T. Garcias Moreira, S. Rabelo Medeiros, L. Pereira Dourado, D. Carmona Cara. **2013**. « Food Components and the Immune System: From Tonic Agents to Allergens ». *Frontiers in Immunology* 4.
- Fatemi, I., F. Delrobaee, M. Bahmani, A. Shamsizadeh, et M. Allahtavakoli. **2019**. « The Effect of the Anti-Diabetic Drug Metformin on Behavioral Manifestations Associated with Ovariectomy in Mice ». *Neuroscience Letters* 690 (janvier): 95-98.
- Fayad, S., R. Nehmé, M. Tannoury, E. Lesellier, C. Pichon, P. Morin. **2017**. « Macroalga *Padina Pavonica* Water Extracts Obtained by Pressurized Liquid Extraction and Microwave-Assisted Extraction Inhibit Hyaluronidase Activity as Shown by Capillary Electrophoresis ». *Journal of Chromatography. A* 1497 (mai): 19-27.
- Fernando, I. P. Shanura, J.W. Nah, et Y.J. Jeon. **2016**. « Potential Anti-Inflammatory Natural Products from Marine Algae ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 48 (décembre): 22-30.
- Ferreres, F., G. Lopes, A. Gil-Izquierdo, P. B. Andrade, C. Sousa, T. Mouga, et P. Valentão. **2012**. « Phlorotannin Extracts from Fucales Characterized by HPLC-DAD-ESI-MSn: Approaches to Hyaluronidase Inhibitory Capacity and Antioxidant Properties ». *Marine Drugs* 10 (12): 2766-81.
- Filisetti-Cozzi, T. M., et N. C. Carpita. **1991**. « Measurement of Uronic Acids without Interference from Neutral Sugars ». *Analytical Biochemistry* 197 (1): 157-62.
- Fleurence, J. **1993**. « Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects ». *Trends in Food Science & Technology* 4 (4): 103-7.
- Fleurence, J. **1999**. « Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses ». *Trends in Food*

Science & Technology 10 (1): 25-28.

- Fleurence, J., C. Le Coeur, S. Mabeau, M. Maurice, A. Landrein. **1995**. « Comparison of Different Extractive Procedures for Proteins from the Edible Seaweeds *Ulva Rigida* and *Ulva Rotundata* ». *Journal of Applied Phycology* 7 (6): 577-82.
- Fuchs, E. **2008**. « Skin Stem Cells: Rising to the Surface ». *The Journal of Cell Biology* 180 (2): 273-84.

G

- García, M. C., P. Puchalska, C. Esteve, et M. L. Marina. **2013**. « Vegetable Foods: A Cheap Source of Proteins and Peptides with Antihypertensive, Antioxidant, and Other Less Occurrence Bioactivities ». *Talanta* 106 (mars): 328-49.
- Garon-Lardière, S. **2004**. « Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales) ». *Thesis, Brest*.
- Gillbro, J. M., et M. J. Olsson. **2011**. « The Melanogenesis and Mechanisms of Skin-Lightening Agents--Existing and New Approaches ». *International Journal of Cosmetic Science* 33 (3): 210-21.
- Golz-Berner, K., L. Zastrow, N. Domloge. **2001**. United States Patent: 6245342 - Cosmetic preparation with a peptide addition. 6245342, issued 12 juin 2001.
- Graham, A., K. Wakamatsu, G. Hunt, S. Ito, A. J. Thody. **1997**. « Agouti Protein Inhibits the Production of Eumelanin and Pheomelanin in the Presence and Absence of α -Melanocyte Stimulating Hormone ». *Pigment Cell Research* 10 (5): 298-303.
- Guerra-Rivas, G., C. M. Gómez-Gutiérrez, G. Alarcón-Arteaga, I. Esthela Soria-Mercado, N. Ernestina Ayala-Sánchez. **2011**. « Screening for Anticoagulant Activity in Marine Algae from the Northwest Mexican Pacific Coast ». *Journal of Applied Phycology* 23 (3): 495-503.
- Guevara, I., J. Iwanejko, A. Dembińska-Kieć, J. Pankiewicz, A. Wanat, P. Anna, et al. **1998**. « Determination of Nitrite/Nitrate in Human Biological Material by the Simple Griess Reaction ». *Clinica Chimica Acta* 274 (2): 177-88.
- Guo, M., J. Mi, Q.M. Jiang, J.M. Xu, Y.Y. Tang, G. Tian, B. Wang. **2014**. « Metformin May Produce Antidepressant Effects through Improvement of Cognitive Function among Depressed Patients with Diabetes Mellitus ». *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 41 (9): 650-56.

H

- Hakozaki, T., L. Minwalla, J. Zhuang, M. Chhoa, A. Matsubara, K. Miyamoto, A. Greatens, G. G. Hillebrand, D. L. Bissett, et R. E. Boissy. **2002**. « The Effect of Niacinamide on Reducing Cutaneous Pigmentation and Suppression of Melanosome Transfer ». *The British Journal of Dermatology* 147 (1): 20-31.
- Hamed, I., F. Özogul, Y. Özogul, J. M. Regenstein. **2015**. « Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits : A Review ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14 (4): 446-65.
- Hamed, S. H., Penkanok Sriwiriyant, Mitchell A. Delong, Marty O. Visscher, R. Randall Wickett, R.E. Boissy. **2006**. « Comparative Efficacy and Safety of Deoxyarbutin, a New Tyrosinase-Inhibiting Agent ». *Journal of Cosmetic Science* 57 (4): 291-308.
- Harnedy, P.A., R. J. FitzGerald. **2011**. « Bioactives proteins, peptides, and amino acids from macroalgae ». *Journal of Phycology* 47 (2): 218-32.
- Hayden, M. S., S. Ghosh. **2008**. « Shared Principles in NF-KappaB Signaling ». *Cell* 132 (3): 344-62.
- Hearing, V. **2003**. Depigmenting activity of agouti signal protein and peptides thereof. United States US20030224972A1, filed 8 mai 2003, et issued 4 décembre 2003.
- Hearing, V. **2011**. « Determination of Melanin Synthetic Pathways ». *The Journal of Investigative Dermatology* 131 (E1): E8-11.
- Hentati, F., C. Delattre, A. V. Ursu, J. Desbrières, D. Le Cerf, C. Gardarin, S. Abdelkafi, P. Michaud, G. Pierre. **2018**. « Structural Characterization and Antioxidant Activity of Water-Soluble Polysaccharides from the Tunisian Brown Seaweed *Cystoseira Compressa* ». *Carbohydrate Polymers* 198 (octobre): 589-600.
- Heo, S.J., J.Y. Hwang, J.I. Choi, S.H. Lee, P.J. Park, D.H. Kang, C. Oh, et al. **2010**. « Protective Effect of Diphlorethohydroxycarmalol Isolated from *Ishige Okamurae* against High Glucose-Induced-Oxidative Stress in Human Umbilical Vein Endothelial Cells ». *Food and Chemical Toxicology : An International*

- Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 48 (6): 1448-54.
- Heo, S.J., W.J. Yoon, K.N. Kim, C. Oh, Y.U. Choi, K.T. Yoon, D.H. Kang, et al. **2012**. « Anti-Inflammatory Effect of Fucoxanthin Derivatives Isolated from *Sargassum Siliquastrum* in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophage ». *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 50 (9): 3336-42.
- Honma, Y., K. Kikuchi, H. Uemura, S. Inaoka, S. Tsunetsugu. **2006**. Peptides that increase collagen or hyaluronic acid production. World Intellectual Property Organization WO2006101187A1
- Hornebeck, W., et J. Wallach. **2009**. « Formation et dégradation des fibres élastiques ». *Médecine & Longévité* 1 (2): 76-82.
- Howren, M. B., D. M. Lamkin, J. Suls. **2009**. « Associations of Depression with C-Reactive Protein, IL-1, and IL-6: A Meta-Analysis ». *Psychosomatic Medicine* 71 (2): 171-86.
- Huneau, J.F, S Mahe, D. Tome. **1997**. « Les Protéines. Tome 1: le métabolisme et les besoins protéiques chez l'homme ». *Dossier scientifique de l'IFN N°9*.
- Hunter, C. A., S. A. Jones. **2015**. « IL-6 as a Keystone Cytokine in Health and Disease ». *Nature Immunology* 16 (5): 448-57.

I

- Iannella, G., A. Greco, D. Didona, B. Didona, G. Granata, A. Manno, B. Pasquariello, G. Magliulo. **2016**. « Vitiligo: Pathogenesis, Clinical Variants and Treatment Approaches ». *Autoimmunity Reviews* 15 (4): 335-43.
- Ilknur, Ak, C. Öztaşkent, Y. Özügrü, T. Göksan. **2015**. « Effect of sodium acetate and sodium nitrate on biochemical composition of green algae *Ulva rigida* ». *Aquaculture International* 23:1-11.
- Isaka, S., K. Cho, S. Nakazono, R. Abu, M. Ueno, D. Kim, T. Oda. **2015**. « Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Porphyrin Isolated from Discolored Nori (*Porphyra Yezoensis*) ». *International Journal of Biological Macromolecules* 74 (mars): 68-75.
- Islam, M. N., I. J. Ishita, S. E. Jin, R. J. Choi, C. M. Lee, et al. **2013**. « Anti-Inflammatory Activity of Edible Brown Alga *Saccharina Japonica* and Its Constituents Pheophorbide a and Pheophytin a in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells ». *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 55 (mai): 541-48.

J

- Jacquot, A., S. F. Gauthier, R. Drouin, Y. Boutin. **2010**. « Proliferative Effects of Synthetic Peptides from β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin on Murine Splenocytes ». *International Dairy Journal* 20 (8): 514-21.
- Je, J.Y., P.-J. Park, E.-K. Kim, J.-S. Park, H.-D. Yoon, K.-R. Kim, C.-B. Ahn. **2009**. « Antioxidant Activity of Enzymatic Extracts from the Brown Seaweed *Undaria Pinnatifida* by Electron Spin Resonance Spectroscopy ». *LWT - Food Science and Technology* 42 (4): 874-78.
- Jenkins, G. **2002**. « Molecular Mechanisms of Skin Ageing ». *Mechanisms of Ageing and Development* 123 (7) / 801-10.
- Jeon, Y. J, S. H. Han, Y. W. Lee, M. Lee, K. H. Yang, H. M. Kim. **2000**. « Dexamethasone Inhibits IL-1 β Gene Expression in LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells by Blocking NF-KB/Rel and AP-1 Activation ». *Immunopharmacology* 48 (2): 173-83.
- Jiao, G., G. Yu, J. Zhang, H. S. Ewart. **2011**. « Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae ». *Marine Drugs* 9 (2): 196-223.
- Jimbow, K., F. Alena, W. Dixon, H. Hara. **1990**. « Regulatory Factors of Pheo- and Eumelanogenesis in Melanogenic Compartments ». *Pigment Cell Research* 3 (S2): 36-42.
- Jin, D.-Q., C.S. Lim, J.-Y. Sung, H. G. Choi, I. Ha, J.-S. Han. **2006**. « *Ulva Conglobata*, a Marine Algae, Has Neuroprotective and Anti-Inflammatory Effects in Murine Hippocampal and Microglial Cells ». *Neuroscience Letters* 402 (1): 154-58.
- Jin, M. H. et al. **2012**. « Cedrol enhances extracellular matrix production in dermal fibroblasts in a MAPKdependent manner ». *Annals of Dermatology* 24, 16-21.
- Jung, H. A., S. E. Jin, B. R. Ahn, C. M. Lee, J. S. Choi. **2013**. « Anti-Inflammatory Activity of Edible Brown Alga

- Eisenia Bicyclis and Its Constituents Fucosterol and Phlorotannins in LPS-Stimulated RAW264.7 Macrophages ». *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 59 (septembre): 199-206.
- Jung, W.-K., S.-J. Heo, Y.-J. Jeon, C.-M. Lee, Y.-M. Park, H.-G. Byun, et al. **2009**. « Inhibitory Effects and Molecular Mechanism of Dieckol Isolated from Marine Brown Alga on COX-2 and INOS in Microglial Cells ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (10): 4439-46.

K

- Kadam, S.U, Brijesh K. Tiwari, et C.P O'Donnell. **2013**. « Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. - PubMed - NCBI ».
- Katsambas, A. D., et A. J. Stratigos. **2001**. « Depigmenting and Bleaching Agents: Coping with Hyperpigmentation ». *Clinics in Dermatology* 19 (4): 483-88.
- Kazir, M., Y. Abuhassira, A. Robin, O. Nahor, J. Luo, A. Israel, A. Golberg, Y. D. Livney. **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 (février): 194-203.
- Kazłowska, K., T. Hsu, C.-C. Hou, W.-C. Yang, G.-J. Tsai. **2010**. « Anti-Inflammatory Properties of Phenolic Compounds and Crude Extract from Porphyra Dentata ». *Journal of Ethnopharmacology* 128 (1): 123-30.
- Kerkelä, E., et U. Saarialho-Kere. **2003**. « Matrix Metalloproteinases in Tumor Progression: Focus on Basal and Squamous Cell Skin Cancer ». *Experimental Dermatology* 12 (2): 109-25.
- Khotimchenko, Y. S. **2016**. « Tyrosinase Inhibitors from Marine Algae ». *British Journal of Dermatology* 175 (3): 457-58.
- Kim, C.-R., Y.-M. Kim, M.-K. Lee, I.-H. Kim, Y.-H. Choi, T.-J. Nam. **2017**. « Pyropia yezoensis peptide promotes collagen synthesis by activating the TGF- β /Smad signaling pathway in the human dermal fibroblast cell line Hs27 ». *International Journal of Molecular Medicine* 39 (1): 31-38.
- Kim, Y.-J., H. Uyama. **2005**. « Tyrosinase Inhibitors from Natural and Synthetic Sources: Structure, Inhibition Mechanism and Perspective for the Future ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 62 (15): 1707-23.
- Kirk, P.L. **1950**. « Kjeldahl Method for Total Nitrogen ». *Analytical Chemistry* 22 (2): 354-58.
- Kloareg, B., R. S. Quatrano. **1988**. « Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides ». *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*.
- Kmail, A., B. Lyoussi, H. Zaid, B. Saad. **2015**. « In vitro Assessments of Cytotoxic and Cytostatic Effects of Asparagus aphyllus, Crataegus aronia, and Ephedra alata in Monocultures and Co- Cultures of Hepg2 and THP-1-Derived Macrophages ». *Pharmacognosy Communications* 5 (septembre): 1-8.
- Ko, H., G. Kim, D. Lee, G.-S. Lee, H.-B. Pyo. **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 (septembre).
- Kopitar-Jerala, N. **2017**. « The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation ». *Frontiers in Immunology* 8 (juillet).
- Kwak, J. Y., J. K. Seok, H.-J. Suh, Y.-H. Choi, S. S. Hong, D. S. Kim, et Y. C. Boo. **2016**. « Antimelanogenic Effects of Luteolin 7-Sulfate Isolated from Phyllospadix Iwatensis Makino ». *The British Journal of Dermatology* 175 (3): 501-11.

L

- Labat-Robert, J., A. Fourtanier, B. Boyer-Lafargue, et L. Robert. **2000**. « Age Dependent Increase of Elastase Type Protease Activity in Mouse Skin. Effect of UV-Irradiation ». *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 57 (2-3): 113-18.
- Lahaye, M., B. Ray. **1996**. « Cell-Wall Polysaccharides from the Marine Green Alga Ulva "Rigida" (Ulvales, Chlorophyta)--NMR Analysis of Ulvan Oligosaccharides ». *Carbohydrate Research* 283 (mars): 161-73.
- Langton, A. K., M. J. Sherratt, C. E. M. Griffiths, et R. E. B. Watson. **2010**. « A New Wrinkle on Old Skin: The

- Role of Elastic Fibres in Skin Ageing ». *International Journal of Cosmetic Science* 32 (5): 330-39.
- Largo, Danilo B., Annie G. Diola, et Mario S. Marababol. **2016**. « Development of an Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) System for Tropical Marine Species in Southern Cebu, Central Philippines ». *Aquaculture Reports* 3 (mai): 67-76.
- Layé, S., G. Gheusi, S. Cremona, C. Combe, K. Kelley, R. Dantzer, et P. Parnet. **2000**. « Endogenous Brain IL-1 Mediates LPS-Induced Anorexia and Hypothalamic Cytokine Expression ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279 (1): R93-98.
- Leandro, A., L. Pereira, A. M. M. Gonçalves. **2020**. « Diverse Applications of Marine Macroalgae ». *Marine Drug*. 18 (1): 17.
- Lee, D. J., Rosenfeldt, H. Grinnell, F. **2000**. Activation of ERK and p38 MAP Kinases in Human Fibroblasts during Collagen Matrix Contraction. *Experimental Cell Research* 257, 190-197 .
- Lee, H.-J., H.-T. Dang, G.-J. Kang, E.-J. Yang, S.-S. Park, W.-J. Yoon, J. H. Jung, et al. **2009**. « Two Enone Fatty Acids Isolated from Gracilaria Verrucosa Suppress the Production of Inflammatory Mediators by Down-Regulating NF-KappaB and STAT1 Activity in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Cells ». *Archives of Pharmacol Research* 32 (3): 453-62.
- Lee, H.-A., I.-H. Kim, T.-J. Nam. **2015**. « Bioactive peptide from Pyropia yezoensis and its antiinflammatory activities ». *International Journal of Molecular Medicine* 36 (6): 1701-6.
- Lee, S. A., S.-M. Moon, Y. H. Choi, S. H. Han, B.-R. Park, M. S. Choi, J.-S. Kim et al. **2017**. « Aqueous Extract of Codium Fragile Suppressed Inflammatory Responses in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Cells and Carrageenan-Induced Rats ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 93 (septembre): 1055-64.
- Lee, Y. S, J. H. Park, M. H. Kim, S. H. Seo, et H. J. Kim. **2006**. « Synthesis of Tyrosinase Inhibitory Kojic Acid Derivative ». *Archiv Der Pharmazie* 339 (3): 111-14.
- Lennie, T. A., D. O. McCarthy, et R. E. Keeseey. **1995**. « Body Energy Status and the Metabolic Response to Acute Inflammation ». *The American Journal of Physiology* 269 (5 Pt 2): R1024-1031.
- Lewis, E. J., et Ella A. Gonzalves. **1960**. « Amino Acid Contents of Some Marine Algae from Bombay ». *New Phytologist* 59 (1): 109-15.
- Lewis, E. J., et Ella A. Gonzalves. **1962**. « Periodic Studies of the Proteins, Peptides, and Free Amino-Acids in Enteromorpha prolifera f. capillaris and Ulva lactuca var. rigida ». *Annals of Botany*, 26 (3) 318-327,
- Lewis, D. C., Medvedev, K., & Seponski, D. M. **2011**. Awakening to the desires of older women: Deconstructing ageism within fashion magazines. *Journal of Aging Studies*, 25(2), 101-109.
- Libert, C., P. Brouckaert, A. Shaw, et W. Fiers. **1990**. « Induction of Interleukin 6 by Human and Murine Recombinant Interleukin 1 in Mice ». *European Journal of Immunology* 20 (3): 691-94.
- Lim, S. N., P. C. K. Cheung, V. E. C. Ooi, et P. O. Ang. **2002**. « Evaluation of Antioxidative Activity of Extracts from a Brown Seaweed, Sargassum Siliquastrum ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (13): 3862-66.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, et R. J. Randall. **1951**. « Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent ». *The Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265-75.
- Luppino, Floriana S., Leonore M. de Wit, Paul F. Bouvy, Theo Stijnen, Pim Cuijpers, Brenda W. J. H. Penninx, et Frans G. Zitman. **2010**. « Overweight, Obesity, and Depression: A Systematic Review and Meta-Analysis of Longitudinal Studies ». *Archives of General Psychiatry* 67 (3): 220-29.
- Lykouras, L. **2008**. « Psychological Profile of Obese Patients ». *Digestive Diseases* (Basel, Switzerland) 26 (1): 36-39.
- Lyman, M., D. G. Lloyd, X. Ji, M. P. Vizcaychipi, D. Ma. **2014**. « Neuroinflammation: The Role and Consequences ». *Neuroscience Research* 79 (février): 1-12.
- Lynch, B., R. Simon, A. Roberts. **2011**. « In Vitro and in Vivo Assessment of the Genotoxic Activity of Aloesin ». *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP* 61 (2): 215-21.

M

- Maes, M. **1999**. « Major Depression and Activation of the Inflammatory Response System ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 461: 25-46.
- Magaki, S., Mueller, C., Dickson, C., Kirsch, W. **2007**. « Increased Production of Inflammatory Cytokines in Mild Cognitive Impairment ». *Experimental Gerontology* 42 (3): 233-40.
- Maguire, J. **2015**. « NETALGAE aims to create a European network of relevant stakeholders within the marine macroalgae sector. » *Report Interreg program NETALGAE* of 2015.
- Majno, G., I. Joris. **2004**. Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology. Oxford University Press.

- Malhotra, V., P. Erlmann. **2015**. « The Pathway of Collagen Secretion ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 31: 109-24.
- Manivannan, D. Karunamoorthy, G. Thirumaran, G. Devi, A. Hemalatha. **2008**. « Biochemical Composition of Seaweeds from Mandapam Coastal Regions along Southeast Coast of India ». *American- Eurasian Journal of Botany* 1 (janvier): 32-37.
- Marionnet, C., C. Pierrard, C. Vioux-Chagnoleau, J. Sok, D. Asselineau, et F. Bernerd. **2006**. « Interactions between Fibroblasts and Keratinocytes in Morphogenesis of Dermal Epidermal Junction in a Model of Reconstructed Skin ». *Journal of Investigative Dermatology* 126 (5): 971-79.
- Martin, M., J. Remy, F. Daburon. **1989**. « Abnormal Proliferation and Aging of Cultured Fibroblasts From Pigs With Subcutaneous Fibrosis Induced by Gamma Irradiation ». *Journal of Investigative Dermatology* 93 (4): 497-500.
- Matta, J., C. Carette, C. Rives Lange, S. Czernichow. **2018**. « Épidémiologie de l'obésité en France et dans le monde ». *La Presse Médicale, Dossier thématique. Chirurgie bariatrique*, 47 (5): 434-38.
- Maugard, T., Bordenave-Juchereau, S., Piot, J.-M., Ben-henda Y., Sirvent P., Peltier S. **2015**. Compositions pour la prévention et/ou le traitement de pathologies liées à l'alphaglycosidase. World Intellectual Property Organization WO2015124867A1, filed 18 février 2015, et issued. 27 août 2015.
- McDermid, K. J., B. Stuercke. **2003**. « Nutritional Composition of Edible Hawaiian Seaweeds ». *Journal of Applied Phycology* 15 (6): 513-24.
- McNeil, M., A. G. Darvill, S. C. Fry, et P. Albersheim. **1984**. « Structure and Function of the Primary Cell Walls of Plants ». *Annual Review of Biochemistry* 53: 625-63.
- Medzhitov, R. **2008**. « Origin and Physiological Roles of Inflammation ». *Nature* 454 (7203): 428-35.
- Mélessopoulos, A. **2012**. "La peau: structure et physiologie. 2nd édition". *Edition TEC&DOC*. Lavoisier
- Melville, F., A. Pulkownik. **2007**. « Investigation of Mangrove Macroalgae as Biomonitors of Estuarine Metal Contamination ». *The Science of the Total Environment* 387 (1-3): 301-9.
- Merz, M., T. Eisele, P. Berends, D. Appel, S. Rabe, I. Blank, T. Stressler, L. Fischer. **2015**. « Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (23): 5682-93.
- Mesnildrey, L., C. Jacob, K. Frangouides, M. Reunavot, M. Lesueur. **2012**. « La filière des macroalgues en France » Rapport d'étude. *NETALGAE - Interreg IVb*, janvier.
- Metin, C., T. Baygar. **2018**. « Determination of nutritional composition of Enteromorpha intestinalis and investigation of its usage as food ». *In* .
- Milledge, J. J., B. Smith, P. W. Dyer, P. Harvey. **2014**. « Macroalgae-Derived Biofuel: A Review of Methods of Energy Extraction from Seaweed Biomass ». *Energies* 7 (11): 7194-7222.
- Min-Jeong, J., K. Su-Nam, C. Hye-Young, S. Woon-Seob, P. Gab-Man. **2006**. « The Inhibitory Effects of Eckol and Dieckol from Ecklonia stolonifera on the Expression of Matrix Metalloproteinase- 1 in Human Dermal Fibroblasts ».
- Minwalla, L., Y. Zhao, J. Cornelius, G. F. Babcock, R. Randall Wickett, I. C. Le Poole, R. E. Boissy. **2001**. « Inhibition of Melanosome Transfer from Melanocytes to Keratinocytes by Lectins and Neoglycoproteins in an In Vitro Model System ». *Pigment Cell Research* 14 (3): 185-94.
- Moffitt, C.M, et L. Cajas-Cano. **2014**. « Blue Growth: The 2014 FAO State of World Fisheries and Aquaculture: Fisheries» Vol 39, No 11.
- Mogensen, T. H. **2009**. « Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses ». *Clinical Microbiology Reviews* 22 (2): 240-73, Table of Contents.
- Montagnat-Rentier, C., W. Rachidi. **2014**. « Vieillesse de la peau et les produits cosmétiques antiâge actuels en pharmacie: la réglementation, leur composition, leur efficacité et l'attente des clients ». Grenoble, France.
- Montanari, D., M. Guglielmo. **2008**. Cosmetic Composition with a Lifting Effect for Sustaining Relaxed Skin Tissues. WO/2008/146116, issued 4 décembre 2008.
- Moonrungssee, N., T. Shimamura, T. Kashiwagi, J. Jakmunee, K. Higuchi, H. Ukeda. **2012**. « Sequential Injection Spectrophotometric System for Evaluation of Mushroom Tyrosinase-Inhibitory Activity ». *Talanta* 101 (novembre): 233-39.
- Mouw, J. K., G. Ou, V. M. Weaver. **2014**. « Extracellular Matrix Assembly: A Multiscale Deconstruction ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (12): 771-85.
- Muise, A., Desmarais, S. **2010**. Women's Perceptions and Use of "Anti-Aging" .*Products.Sex Roles*, 154-165.
- Mukhopadhyay, S., J. R. Hoidal, T. K. Mukherjee. **2006**. « Role of TNFalpha in Pulmonary Pathophysiology ». *Respiratory Research* 7 (octobre): 125.
- Murase, D., A. Hachiya, K. Takano, R. Hicks, M. O. Visscher, T. Kitahara, et al. **2013**. « Autophagy Has a Significant Role in Determining Skin Color by Regulating Melanosome Degradation in Keratinocytes ».

The Journal of Investigative Dermatology 133 (10): 2416-24.

N

- Nakagawa, M., K. Kawai, et K. Kawai. **1995**. « Contact Allergy to Kojic Acid in Skin Care Products ». *Contact Dermatitis* 32 (1): 9-13.
- Naylor, E.C, R. E. B. Watson, et M. J. Sherratt. **2011**. « Molecular Aspects of Skin Ageing ». *Maturitas* 69 (3): 249-56.

O

- Ochiai, A., S. Tanaka, T. Tanaka, et M. Taniguchi. **2016**. « Rice Bran Protein as a Potent Source of Antimelanogenic Peptides with Tyrosinase Inhibitory Activity ». *Journal of Natural Products* 79 (10): 2545-51.
- Olumide, Y. M., A. O. Akinkugbe, D. Altraide, T. Mohammed, N. Ahamefule, S. Ayanlowo, C. Onyekonwu, et N. Essen. **2008**. « Complications of Chronic Use of Skin Lightening Cosmetics ». *International Journal of Dermatology* 47 (4): 344-53.
- Ortiz, J., N. Romero, P. Robert, J. Araya, J. Lopez-Hernández, C. Bozzo, E. Navarrete, A. Osorio, et A. Rios. **2006**. « Dietary Fiber, Amino Acid, Fatty Acid and Tocopherol Contents of the Edible Seaweeds *Ulva Lactuca* and *Durvillaea Antarctica* ». *Food Chemistry* 99 (1): 98-104.
- Ortonne, J.-P. **2006**. « Retinoid Therapy of Pigmentary Disorders ». *Dermatologic Therapy* 19 (5): 280-88.
- Owens, S., B. Gutin, M. Ferguson, J. Allison, W. Karp, et N. A. Le. **1998**. « Visceral Adipose Tissue and Cardiovascular Risk Factors in Obese Children ». *The Journal of Pediatrics* 133 (1): 41-45.

P

- Pacheco, B. S., M. A. Ziemann Dos Santos, E. Schultze, R. Mastelari Martins, R. Guerra Lund, F. Kömmling Seixas, et al. **2018**. « Cytotoxic Activity of Fatty Acids From Antarctic Macroalgae on the Growth of Human Breast Cancer Cells ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 6: 185.
- Palanisamy, S., M. Vinosha, T. Marudhupandi, P. Rajasekar, et N. Marimuthu Prabhu. **2017**. « Isolation of Fucoïdan from *Sargassum Polycystum* Brown Algae: Structural Characterization, in Vitro Antioxidant and Anticancer Activity ». *International Journal of Biological Macromolecules* 102 (septembre): 405-12.
- Pangestuti, R, et S-K Kim. **2011**. « Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae ». *Journal of Functional Foods* 3 (4): 255-66.
- Papaspyrides, C. D., et S. A. Protopapas. **1988**. « E.s.r. Approach on Hydroquinone-Melanin Possible Interaction ». *International Journal of Biological Macromolecules* 10 (1): 62-63.
- Park, E.-J., J.-I. Choi. **2017**. « Melanogenesis Inhibitory Effect of Low Molecular Weight Fucoïdan from *Undaria Pinnatifida* ». *Journal of Applied Phycology* 29 (5): 2213-17.
- Park, H. Y., M. H. Han, C. Park, C.-Y. Jin, G.-Y. Kim, I.-W. Choi, N. D. Kim, T.-J. Nam, T. K. Kwon, et Y. H. Choi. **2011**. « Anti-Inflammatory Effects of Fucoïdan through Inhibition of NF-KB, MAPK and Akt Activation in Lipopolysaccharide-Induced BV2 Microglia Cells ». *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 49 (8): 1745-52.
- Park, J., J.-D. Cha, K.-M. Choi, K.-Y. Lee, K. M. Han, et Y.-S. Jang. **2017**. « Fucoïdan Inhibits LPS-Induced Inflammation in Vitro and during the Acute Response in Vivo ». *International Immunopharmacology* 43 (février): 91-98.
- Park, S. H., E. Choi, S. Kim, D. S. Kim, J. H. Kim, S. G. Chang, J. S. Choi, et al. **2018**. « Oxidative Stress-Protective and Anti-Melanogenic Effects of Loliolide and Ethanol Extract from Fresh Water Green Algae, *Prasiola Japonica* ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (9).
- Peasura, N., N. Laohakunjit, O. Kerdchoechuen, S. Wanlapa. **2015**. « Characteristics and Antioxidant of *Ulva Intestinalis* Sulphated Polysaccharides Extracted with Different Solvents ». *International Journal of Biological Macromolecules* 81 (novembre): 912-19.
- Pereira, L. **2018**. « Seaweeds as Source of Bioactive Substances and Skin Care Therapy—Cosmeceuticals,

- Algothotherapy, and Thalassotherapy ». *Cosmetics* 5 (4): 68.
- Perez, R. **1997**. « Ces algues qui nous entourent - Conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisation, culture ». *Librairie Quae*.
- Pesteil, F., L. Vignaud, F. Bonté, et A. Desmoulière. **2017**. « Rôles primordiaux des fibroblastes dermiques dans la cicatrisation cutanée ». *Revue Francophone de Cicatrisation* 1 (3): 45-49.
- Pettett, P. **2009**. « Preliminary investigation into the induction of reproduction in *Ulva* spp. in Southeast Queensland for mass cultivation purposes ». Masters, University of the Sunshine Coast.
- Pillaiyar, T., M. Manickam, et S.-H. Jung. **2017**. « Downregulation of Melanogenesis: Drug Discovery and Therapeutic Options ». *Drug Discovery Today* 22 (2): 282-98.
- Poiroux, G. **2011**. « Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux: application à la photochimiothérapie ». Toulouse.
- Polikovskiy, M., F. Fernand, M. Sack, W. Frey, G. Müller, A. Golberg. **2019**. « *In silico* food allergenic risk evaluation of proteins extracted from macroalgae *Ulva* sp. with pulsed electric fields ». *Food Chemistry* 276. 735-744
- Pop, C. **2009**. « Natural Resources Containing Arbutin. Determination of Arbutin in the Leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. acclimated in Romania » *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2.
- Pratoomthai, B., T. Songtavisin, W. Gangnonngiw, et K. Wongprasert. **2018**. « In Vitro Inhibitory Effect of Sulfated Galactans Isolated from Red Alga *Gracilaria Fisheri* on Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells ». *Journal of Applied Phycology* 30 (4): 2611-18.
- Probert, L. **2015**. « TNF and Its Receptors in the CNS: The Essential, the Desirable and the Deleterious Effects ». *Neuroscience* 302 (août): 2-22.
- Prost-squarcioni, C. **2006**. « Histologie de la peau et des follicules pileux ». *Med Sci (Paris)*. 22(2): 131-137.
- Prost-squarcioni, C., S. Fraïtag, M. Heller, et N. Boehm. **2008**. « Histologie fonctionnelle du derme ». *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. Volume 135, n° 1P3. pages 5-20
- Prud'homme van Reine, W. F., et G. C. Trono. **2001**. « Plant Resources of South-East Asia No. 15(1): Cryptogams: Algae. » *Plant Resources of South-East Asia* No. 15(1): Cryptogams: Algae.

Q

- Qin, L., Y. Wu, Y. Liu, Y. Chen, et P. Zhang. **2014**. « Dual Effects of Alpha-Arbutin on Monophenolase and Diphenolase Activities of Mushroom Tyrosinase ». *PloS One* 9 (10): e109398.

R

- Radmer, R. **1996**. « Algal Diversity and Commercial Algal Products New and valuable products from diverse algae may soon increase the already large market for algal products ». *BioScience*. Vol. 46, No. 4, Marine Biotechnology, pp. 263-270
- Rahimi, F., M. Tabarsa, et M. Rezaei. **2016**. « Ulvan from Green Algae *Ulva Intestinalis*: Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction and Antioxidant Activity ». *Journal of Applied Phycology* 28 (5): 2979-90.
- Ratnasooriya, W. D., G. A. Premakumara, et L. M. Tillekeratne. **1994**. « Post-Coital Contraceptive Activity of Crude Extracts of Sri Lankan Marine Red Algae ». *Contraception* 50 (3): 291-99.
- Raven, P, S Eichhorn, et R Evert. **2007**. « Biologie végétale » 3ème édition - Librairie Eyrolles .
- Reed M.J., Ferara N.S., Vernon R.B. **2001**. « Impaired migration, integrin function, and actin cytoskeletal organization in dermal fibroblasts from a subset of aged human donors ». *Mechanisms of Ageing an Development*, 122 (11) , pp. 1203-1220.
- Régnier, M., C. Tremblaye, et R. Schmidt. **2005**. « Vitamin C Affects Melanocyte Dendricity via Keratinocytes ». *Pigment Cell Research* 18 (5): 389-90.
- Reichenberg, A., R. Yirmiya, A. Schuld, T. Kraus, M. Haack, A. Morag, et T. Pollmächer. **2001**. « Cytokine-Associated Emotional and Cognitive Disturbances in Humans ». *Archives of General Psychiatry* 58 (5): 445-52.
- Reiskind, J.B., S. Beer., G. Bowes. **1989**. Photosynthesis, photorespiration and ecophysiological interactions in marine macroalgae. *Aquatic Botany*. 34 (1-3) 131-152

- Remacle, J. A., A. Houbion, et A. Houben. **1980**. « Subcellular Fractionation of WI-38 Fibroblasts: Comparison between Young and Old Cells ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 630 (1): 57-70.
- Ricard-Blum, S., F. Ruggiero. **2005**. « The Collagen Superfamily: From the Extracellular Matrix to the Cell Membrane ». *Pathologie Biologie* 53 (7): 430-42.
- Richter, W. O., B. Jacob, et P. Schwandt. **1983**. « Molecular Weight Determination of Peptides by High-Performance Gel Permeation Chromatography ». *Analytical Biochemistry* 133 (2): 288-91.
- Rouxel, C., E. Bonnabeze, A. Daniel, M. Jérôme, M. Etienne, et J. Fleurence. **2001**. « Identification by SDS PAGE of Green Seaweeds (Ulva and Enteromorpha) Used in the Food Industry ». *Journal of Applied Phycology* 13 (3): 215-18.
- Ruangchuay, R., C. Lueangthuwapranit, et N. Piantumdee. **2007**. « Apparent Characteristics and Taxonomic Study of Macroalgae in Pattani Bay » 29 (4): 13.
- Ruggiero, F., M. Roulet, et C. Bonod-Bidaud. **2005**. « Les collagènes du derme : au-delà de leurs propriétés structurales ». *Journal de la Société de Biologie* 199 (4): 301-11.

S

- Saghaie, L., M. Pourfarzam, A. Fassihi, et B. Sartippour. **2013**. « Synthesis and Tyrosinase Inhibitory Properties of Some Novel Derivatives of Kojic Acid ». *Research in Pharmaceutical Sciences* 8 (4): 233-42.
- Sánchez-Ferrer, A., J. N. Rodríguez-López, F. García-Cánovas, et F. García-Carmona. **1995**. « Tyrosinase: A Comprehensive Review of Its Mechanism ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1247 (1): 1-11.
- Sanjeeva, K. K. Asanka, I. P. Shanura Fernando, E.-A. Kim, G. Ahn, Y. Jee, et Y.-J. Jeon. **2017**. « Anti-Inflammatory Activity of a Sulfated Polysaccharide Isolated from an Enzymatic Digest of Brown Seaweed *Sargassum Horneri* in RAW 264.7 Cells ». *Nutrition Research and Practice* 11 (1): 3-10.
- Santini, A., S. M. Cammarata, G. Capone, A. Ianaro, G. C. Tenore, L. Pani, et E. Novellino. **2018**. « Nutraceuticals: Opening the Debate for a Regulatory Framework ». *British Journal of Clinical Pharmacology* 84 (4): 659-72.
- Schallreuter, K., A. Slominski, J. M. Pawelek, K. Jimbow, et B. A. Gilchrist. **1998**. « What Controls Melanogenesis? » *Experimental Dermatology* 7 (4): 143-50.
- Seiji, M., T. B. Fitzpatrick, et M. S. Birbeck. **1961**. « The Melanosome: A Distinctive Subcellular Particle of Mammalian Melanocytes and the Site of Melanogenesis ». *The Journal of Investigative Dermatology* 36 (avril): 243-52.
- Senevirathne, M., C.-B. Ahn, et J.-Y. Je. **2010**. « Enzymatic Extracts from Edible Red Algae, *Porphyra tenera*, and Their Antioxidant, Anti-acetylcholinesterase, and Anti-inflammatory Activities ». *Food Sci. Biotechnol.* 19 (décembre): 1551-57.
- Senni, K., F. Gueniche, A. Foucault-Bertaud, S. Igondjo-Tchen, F. Fioretti, et al. **2006**. « Fucoidan a Sulfated Polysaccharide from Brown Algae Is a Potent Modulator of Connective Tissue Proteolysis ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 445 (1): 56-64.
- Serhan, C. N., et J. Savill. **2005**. « Resolution of Inflammation: The Beginning Programs the End ». *Nature Immunology* 6 (12): 1191-97.
- Shabab, T., R. Khanabdali, S. Zorofchian, et G. Mohan. **2016**. « Neuroinflammation pathways: a general review » *International Journal of Neuroscience: Vol 127, No 7* . 2016.
- Shibata, T., K. Fujimoto, K. Nagayama, K. Yamaguchi, et T. Nakamura. **2002**. « Inhibitory Activity of Brown Algal Phlorotannins against Hyaluronidase ». *International Journal of Food Science & Technology* 37 (6): 703-9.
- Shin, E.-S., H.-J. Hwang, I.-H. Kim, et T.-J. Nam. **2011**. « A Glycoprotein from *Porphyra Yezoensis* Produces Anti-Inflammatory Effects in Liposaccharide-Stimulated Macrophages via the TLR4 Signaling Pathway ». *International Journal of Molecular Medicine* 28 (5): 809-15.
- Siegrist, W., R. Drozd, R. Cotti, D. H. Willard, W. O. Wilkison, et A. N. Eberle. **1997**. « Interactions of α -Melanotropin and Agouti on B16 Melanoma Cells: Evidence for Inverse Agonism of Agouti ». *Journal of Receptors and Signal Transduction* 17 (1-3): 75-98.
- Silswal, N., A. K. Singh, B. Aruna, S. Mukhopadhyay, S. Ghosh, et N. Z. Ehtesham. **2005**. « Human Resistin Stimulates the Pro-Inflammatory Cytokines TNF-Alpha and IL-12 in Macrophages by NF-KappaB-Dependent Pathway ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334 (4): 1092-1101.
- Silva, L. M. C. Melo, V. Lima, M. Lima Holanda, P. Goes Pinheiro, J. Ariévil Gurgel Rodrigues, M. E. Pereira Lima, et N. M. Barros Benevides. **2010**. « Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Lectin

- from Marine Red Alga *Pterocladia Capillacea* ». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 33 (5): 830-35.
- Simon, J. D., D. Peles, K. Wakamatsu, et S. Ito. **2009**. « Current Challenges in Understanding Melanogenesis: Bridging Chemistry, Biological Control, Morphology, and Function ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 22 (5): 563-79.
- Slominski, A., D. J. Tobin, S. Shibahara, et J. Wortsman. **2004**. « Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation ». *Physiological Reviews* 84 (4): 1155-1228.
- Şöhretoğlu, D., S. Sari, B. Barut, et A. Özel. **2018**. « Tyrosinase Inhibition by Some Flavonoids: Inhibitory Activity, Mechanism by in Vitro and in Silico Studies ». *Bioorganic Chemistry* 81 (décembre): 168-74.
- Song, Y. S., M. C. Balcos, H.-Y. Yun, K. J. Baek, N. S. Kwon, M.-K. Kim, et D.-S. Kim. **2015**. « ERK Activation by Fucoidan Leads to Inhibition of Melanogenesis in Mel-Ab Cells ». *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 19 (1): 29-34.
- Sorrells, S. F., J. R. Caso, C. D. Munhoz, et R. M. Sapolsky. **2009**. « The Stressed CNS: When Glucocorticoids Aggravate Inflammation ». *Neuron* 64 (1): 33-39.
- Spieler, R. **2002**. « Seaweed Compound's Anti-HIV Efficacy Will Be Tested in Southern Africa ». *Lancet* (London, England) 359 (9318): 1675.
- Sun, J., S. Zhang, X. Zhang, X. Zhang, H. Dong, et Y. Qian. **2015**. « IL-17A Is Implicated in Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation and Cognitive Impairment in Aged Rats via Microglial Activation ». *Journal of Neuroinflammation* 12 (septembre): 165.
- Sun, Y, et M. Chavan. **2017**. Cosmetic compositions comprising marine plants. United States US9603790B2, filed 12 novembre 2013, et issued 28 mars 2017.

T

- Tabarsa, M., J. H. Han, C. Y. Kim, et S. G. You. **2012**. « Molecular Characteristics and Immunomodulator Activities of Water-Soluble Sulfated Polysaccharides from *Ulva Pertusa* ». *Journal of Medicinal Food* 15 (2): 135-44.
- Tabarsa, M., S.G. You, E. H. Dabaghian, et U. Surayot. **2018**. « Water-Soluble Polysaccharides from *Ulva Intestinalis*: Molecular Properties, Structural Elucidation and Immunomodulatory Activities ». *Journal of Food and Drug Analysis* 26 (2): 599-608.
- Taboada, C., R. Millán, et I. Míguez. **2010**. « Composition, Nutritional Aspects and Effect on Serum Parameters of Marine Algae *Ulva Rigida* ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90 (3): 445-49.
- Tanimoto, K., A. Suzuki, S. Ohno, K. Honda, N. Tanaka, T. Doi, K. Yoneno, et al. **2004**. « Effects of TGF-Beta on Hyaluronan Anabolism in Fibroblasts Derived from the Synovial Membrane of the Rabbit Temporomandibular Joint ». *Journal of Dental Research* 83 (1): 40-44.
- Terme, N., R. Boulho, J.-P. Kucma, N. Bourgougnon, et G. Bedoux. **2018**. « Radical Scavenging Activity of Lipids from Seaweeds Isolated by Solid-Liquid Extraction and Supercritical Fluids ». *OCL* 25 (5): D505.
- Thomas, N. Vinay, et S.-K. Kim. **2013**. « Beneficial Effects of Marine Algal Compounds in Cosmeceutical ». *Marine Drugs* 11 (1): 146-64.
- Thompson, K. D., et C. Dragar. **2004**. « Antiviral Activity of *Undaria Pinnatifida* against Herpes Simplex Virus ». *Phytotherapy Research: PTR* 18 (7): 551-55.
- Tilg, H., et A. R. Moschen. **2006**. « Adipocytokines: Mediators Linking Adipose Tissue, Inflammation and Immunity ». *Nature Reviews. Immunology* 6 (10): 772-83.
- Tiwari, B. K., et D. J. Troy. **2015**. « Chapter 1 - Seaweed Sustainability – Food and Nonfood Applications ». *In Seaweed Sustainability*, 1-6. San Diego: Academic Press.
- Tremblin, G. **2016**. « The algae, a resource with multiple applications: Nutrition, Health, Cosmetics, Bioenergy, Environment ». *Nutrition & santé* 5 (juin): 33-44.
- Tripathi, P., P. Tripathi, L. Kashyap, et V. Singh. **2007**. « The role of nitric oxide in inflammatory reactions ». *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 51 (3): 443-52.
- Tsuchiya, M., V. Piras, S. Choi, S. Akira, M. Tomita, A. Giuliani, et K. Selvarajoo. **2009**. « Emergent Genome-Wide Control in Wildtype and Genetically Mutated Lipopolysaccharides-Stimulated Macrophages ». *PLoS one* 4 (mars): e4905.
- Tunzi, M., et G. R. Gray. **2007**. « Common Skin Conditions during Pregnancy ». *American Family Physician* 75 (2): 211-18.

U

Uitto, J., et E. F. Bernstein. **1998**. « Molecular Mechanisms of Cutaneous Aging: Connective Tissue Alterations in the Dermis ». *The Journal of Investigative Dermatology*. Symposium Proceedings 3 (1): 41-44.

V

- Vachtenheim, J., et J. Borovanský. **2010**. « “Transcription Physiology” of Pigment Formation in Melanocytes: Central Role of MITF ». *Experimental Dermatology* 19 (7): 617-27.
- Van Keymeulen, A., G. Mascre, K.K. Youseff, I. Harel, C. Michaux, et N. De Geest. **2009**. « Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis » *The Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press
- Varatharaj, A., et I. Galea. **2017**. « The Blood-Brain Barrier in Systemic Inflammation ». *Brain, Behavior, and Immunity* 60 (février): 1-12.
- Vauchel, P. **2007**. « Optimisation de procédés innovants pour l’obtention de phycocolloïdes ». Thesis, Nantes.
- Verdy, C., J.-E. Branka, et N. Mekideche. **2012**. « Melanosome Transfer Evaluation by Quantitative Measurement of Pmel 17 in Human Normal Melanocyte-Keratinocyte Co-Cultures: Effect of an *Alaria Esculenta* Extract ». *Journal of Cosmetic Science* 63 (3): 197-203.
- Viatour, P., M.-P. Merville, V. Bours, et A. Chariot. **2005**. « Phosphorylation of NF-KappaB and IkappaB Proteins: Implications in Cancer and Inflammation ». *Trends in Biochemical Sciences* 30 (1): 43-52.
- Violle, N., P. Rozan, et H. Demais. **2017**. « Evaluation of the antidepressant- and anxiolytic-like effects of a hydrophilic extract from the green seaweed *Ulva* sp. in rats ». *Nutritional Neuroscience: Vol 21, No 4* .
- Vo, T.-S., et S.-K. Kim. **2012**. « Cosmeceutical Compounds From Marine Sources ». In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 1-17. American Cancer Society.

W

- Wang, H.-M. D., C.-C. Chen, P. Huynh, et J.-S. Chang. **2015**. « Exploring the Potential of Using Algae in Cosmetics ». *Bioresource Technology, Advances in biofuels and chemicals from algae*, 184 (mai): 355-62.
- Wang, L., Y. R. Cui, H.-W. Yang, H. Geun Lee, J.-Y. Ko, et Y.-J. Jeon. **2019**. « A Mixture of Seaweed Extracts and Glycosaminoglycans from Sea Squirts Inhibits α -MSH-Induced Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells ». *Fisheries and Aquatic Sciences* 22 (1): 11.
- Wang, Q. Raghov, R. **1999**. « Molecular mechanisms of regulation of type I collagen biosynthesis ». *Proceedings of the Indian Academy of Sciences. Chemical Sciences* 111, 185-195
- Wang, Z.-J., W. Xu, J.-W. Liang, C.-S. Wang, et Y. Kang. **2017**. « Effect of fucoidans on B16 murine melanoma cell melanin formation and apoptosis ». *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines* 14 (4): 149-55.
- Weisberg, Stuart P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, et A. W. Ferrante. **2003**. « Obesity Is Associated with Macrophage Accumulation in Adipose Tissue ». *The Journal of Clinical Investigation* 112 (12): 1796-1808.
- Weldon, M. M., M. S. Smolinski, A. Maroufi, B. W. Hastay, D. L. Gilliss, L. L. Boulanger, L. S. Balluz, et R. J. Dutton. **2000**. « Mercury Poisoning Associated with a Mexican Beauty Cream ». *The Western Journal of Medicine* 173 (1): 15-18; discussion 19.
- Wijesekara, I., M. Lang, C. Marty, M.-P. Gemin, R. Boulho, P. Douzenel, I. Wickramasinghe, G. Bedoux, et N. Bourgougnon. **2017**. « Different Extraction Procedures and Analysis of Protein from *Ulva* Sp. in Brittany, France ». *Journal of Applied Phycology* 29 (5): 2503-11.
- Winocur, G., et C. E. Greenwood. **2005**. « Studies of the Effects of High Fat Diets on Cognitive Function in a Rat Model ». *Neurobiology of Aging* 26 Suppl 1 (décembre): 46-49.
- Woychik, R. P., S. J. Bultman, et E.J. Michaud. **2001**. Agouti polypeptide compositions. United States US6310034B1, filed 3 mars 1998, et issued 30 octobre 2001.

X

- Xiao, Y. Q., K. Malcolm, G. S. Worthen, S. Gardai, W. P. Schiemann, V. A. Fadok, D. L. Bratton, et P. M. Henson. **2002**. « Cross-Talk between ERK and P38 MAPK Mediates Selective Suppression of pro-Inflammatory Cytokines by Transforming Growth Factor-Beta ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (17): 14884-93.

Y

- Yaar, M., et B. A. Gilchrist. **2007**. « Photoageing: Mechanism, Prevention and Therapy ». *The British Journal of Dermatology* 157 (5): 874-87.
- Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, et al. **2003**. « Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-like Receptor Signaling Pathway ». *Science* (New York, N.Y.) 301 (5633): 640-43.
- Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, et al. **2003**. « TRAM Is Specifically Involved in the Toll-like Receptor 4-Mediated MyD88-Independent Signaling Pathway ». *Nature Immunology* 4 (11): 1144-50.
- Yanagisawa, M., S. Kawai, et K. Murata. **2013**. « Strategies for the Production of High Concentrations of Bioethanol from Seaweeds: Production of High Concentrations of Bioethanol from Seaweeds ». *Bioengineered* 4 (4): 224-35.
- Yang, H., M. Zeng, S. Dong, Z. Liu, et R. Li. **2010**. « Anti-Proliferative Activity of Phlorotannin Extracts from Brown Algae *Laminaria Japonica* Aresch ». *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 28 (1): 122-30.
- Yirmiya, R., Y. Pollak, M. Morag, A. Reichenberg, O. Barak, R. Avitsur, Y. Shavit, et al. **2000**. « Illness, Cytokines, and Depression ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 917: 478-87.
- Yoon, H.S., N.-H. Lee, C.-G. Hyun, et D.-B. Shin. **2015**. « Differential Effects of Methoxylated P-Coumaric Acids on Melanoma in B16/F10 Cells ». *Preventive Nutrition and Food Science* 20 (1): 73-77.
- Yoon, N. Y., T.-K. Eom, M.-M. Kim, et S.-K. Kim. **2009**. « Inhibitory Effect of Phlorotannins Isolated from *Ecklonia cava* on Mushroom Tyrosinase Activity and Melanin Formation in Mouse B16F10 Melanoma Cells ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (10): 4124-29.
- Young, K. 2014. Should women be worrying about wrinkles at 24. <http://fashion.telegraph.co.uk/beauty/newsfeatures/TMG10846305/Should-womenbe-worrying-about-wrinkles-at-24.html>

Z

- Zaragozá, M. C., D. López, M. P. Sáiz, M. Poquet, J. Pérez, P. Puig-Parellada, F. Màrmol, et al. **2008**. « Toxicity and Antioxidant Activity in Vitro and in Vivo of Two *Fucus Vesiculosus* Extracts ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (17): 7773-80.
- Zemdegs J., Martin H., Pintana H., Bullich S., Manta S., Marques M.A., Moro C., (...), Guiard B.P. **2019**. Metformin promotes anxiolytic and antidepressant-like responses in insulin-resistant mice by decreasing circulating branched-chain amino acids. *Journal of Neuroscience*, 39 (30) , pp. 5935-5948.
- Zhang, C., Y. Li, X. Shi, et S.-K. Kim. **2010**. « Inhibition of the Expression on MMP-2, 9 and Morphological Changes via Human Fibrosarcoma Cell Line by 6,6'-Bieckol from Marine Alga *Ecklonia Cava* ». *BMB Reports* 43 (1): 62-68.
- Zhang, G., et S. Ghosh. **2000**. « Molecular Mechanisms of NF-KappaB Activation Induced by Bacterial Lipopolysaccharide through Toll-like Receptors ». *Journal of Endotoxin Research* 6 (6): 453-57.

Titre :

Valorisation des fractions issues d'un procédé industriel éco-compatible de raffinage de macroalgues marines

Résumé :

L'entreprise SEPROSYS est une société spécialisée dans le développement de solutions d'extraction, de séparation et de purification de molécules d'intérêts. Au cours de l'année 2011, l'entreprise a développé un procédé innovant et éco-compatible de séparation et de purification fractionnée de biomolécules issues de macroalgues marines dont l'objectif est de valoriser une biomasse locale, via un procédé de fractionnement ne faisant pas intervenir de solvant ou d'acide. Ces travaux de thèse ont pour objectif d'identifier des applications potentiellement commercialisables pour les différentes fractions de macroalgues marines extraites selon le procédé développé par la société SEPROSYS, et en particulier, dans deux domaines distincts : en dermocosmétique pour leur activité anti-âge et anti-tâche, et en nutraceutique pour leur activité anti-inflammatoire. La première partie de nos travaux concerne l'amélioration du procédé, la caractérisation des fractions protéiques ainsi que la production de fractions peptidiques et oligosaccharidiques provenant d'*Ulva rigida* et *Ulva intestinalis*. La deuxième partie est consacrée à l'évaluation du potentiel « anti-âge » et du potentiel « anti-tâche » des différentes fractions provenant d'*Ulva rigida* et *Ulva intestinalis*. Dans ce but, l'impact des différentes fractions sur la biosynthèse de collagène et d'acide hyaluronique de lignées fibroblastiques, puis par la suite l'effet des fractions sur la production *in vitro* de mélanine par des mélanocytes murins ont été étudié. De plus, l'objectif de ce travail consiste également à mieux comprendre la relation structure-fonction de l'activité anti-âge des fractions protéiques. La troisième partie s'intègre au sein d'un projet dénommé Neuronalg, dont l'objectif est le développement d'actifs nutritionnels algo-sourcés, ciblant l'inflammation et les mécanismes d'altérations du comportement émotionnel liés aux troubles métaboliques. Pour cela, les activités anti-inflammatoires des fractions produites sur des macrophages murins à travers la quantification de monoxyde d'azote produit, associée au niveau transcription de protéines cibles comme iNOS (NO synthase inductible) et de cytokines pro- et anti-inflammatoires.

Mots-clés :

Ulva intestinalis, *Ulva rigida*, Extraction et purification, polysaccharides sulfatés, protéines, hydrolyse enzymatique, collagène, acide Hyaluronique, fibroblastes, mélanocytes, mélanine, anti-inflammatoire, macrophages.

Title:

Valorisation of fractions from eco-compatible industrial process from marine macroalgal refining

Abstract:

SEPROSYS company is specialized in the development of processes for the extraction, separation, and purification of molecules of interest. In 2011, the company developed an innovative and eco-compatible process for the separation and fractional purification of biomolecules from marine macroalgae. The aim of this thesis is to identify potentially applications for the different fractions extracted using the process developed by SEPROSYS, and in particular, in two distinct fields: in dermocosmetic for anti-aging and anti-stain activity, and in nutraceutical for anti-inflammatory activity. The first part concerns the improvement of the process, the characterization of protein fractions as well as the production of peptide and oligosaccharide fractions from *Ulva rigida* and *Ulva intestinalis*. The second part is devoted to the evaluation of the "anti-aging" and "anti-stain" potential of the different fractions from *Ulva rigida* and *Ulva intestinalis*. Thus, the impact of our fractions on the biosynthesis of collagen and hyaluronic acid from fibroblast lines were studied, as well as the effect of the fractions on the in vitro production of melanin by murine melanocytes. In addition, the aim of this work is also to better understand the structure-function relationship of the anti-aging activity of protein fractions. The third part concerns a project called Neuronalg, whose objective is the development of alga-sourced nutritional actives, targeting inflammation and mechanisms of alterations in emotional behaviour linked to metabolic disorders. This will be achieved through the anti-inflammatory activities of fractions on mouse macrophages through the quantification of nitric oxide produced, associated with the transcription level of target proteins such as iNOS (inducible NO synthase) and pro- and anti-inflammatory cytokines.

Keywords:

Ulva intestinalis, *Ulva rigida*, Extraction and purification, Proteins, Enzyme hydrolysis, Collagen, Hyaluronic acid, Fibroblasts, Melanocytes, Melanin, Anti-inflammatory, Macrophages.