



HAL
open science

Evaluation du potentiel anti-âge d'exopolysaccharides issus de microalgues

Claire Toucheteau

► **To cite this version:**

Claire Toucheteau. Evaluation du potentiel anti-âge d'exopolysaccharides issus de microalgues. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2020. Français. NNT : 2020LAROS008 . tel-03934558

HAL Id: tel-03934558

<https://theses.hal.science/tel-03934558v1>

Submitted on 11 Jan 2023

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

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



UNIVERSITE DE LA ROCHELLE

ECOLE DOCTORALE *EUCLIDE*

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266 CNRS-ULR
Equipe Biotechnologies et Chimie des Bioressources pour la Santé (BCBS)

THESE CONFIDENTIELLE

Présentée par :

Claire TOUCHETEAU

Thèse soutenue le 25 mai 2020

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle
Discipline : Valorisation chimique et biologique des agroressources.

Evaluation du potentiel anti-âge d'exopolysaccharides issus de microalgues

JURY :

Mme BOURGOUGNON Nathalie	Professeure, Université Bretagne Sud, Rapportrice
Mme COLLIEC-JOUAULT Sylvia	Directrice de recherche Ifremer, Nantes, Rapportrice
Mr MICHAUD Philippe	Professeur, Université de Clermont-Auvergne, Examineur et Président de jury
Mr BRIDIAU Nicolas	Maître de conférences, Université de La Rochelle, Encadrant scientifique
Mme ARNAUDIN Ingrid	Professeure, Université de La Rochelle, Co-directrice de thèse
Mr MAUGARD Thierry	Professeur, Université de La Rochelle, Co-directeur de thèse

Contributions scientifiques.

Brevets :

Toucheteau C., Bridiau N., Maugard T., Arnaudin I., Gonçalves O., Pruvost J., Masse A., Decamp A., Probert I., Gaignard C., Laroche C., Pierre G., Delattre C., Dubessay Pascal., Michaud P., Lecerf D., Picton L., Dulong V., Rihouey C., Déclaration d'invention en cours de dépôt par la SATT OUEST VALORISATION. **Mise en œuvre de polysaccharides de microalgues comme actifs biologiques : Utilisation d'exopolysaccharides issus de microalgues pour la prévention et/ou le traitement du vieillissement cutané.**

Lecerf D., Picton L., Dulong V., Rihouey C., **Toucheteau C.**, Bridiau N., Maugard T., Arnaudin I., Gonçalves O., Pruvost J., Masse A., Decamp A., Probert I., Gaignard C., Laroche C., Pierre G., Delattre C., Dubessay Pascal., Michaud P., Déclaration d'invention en cours de dépôt par la SATT OUEST VALORISATION. **Mise en œuvre de polysaccharide de microalgues comme agents texturants.**

Revue scientifique :

Prybylski, N., **Toucheteau, C.**, El Alaoui, H., Bridiau, N., Maugard, T., Abdelkafi, S., Fendri, I., Delattre, C., Dubessay, P., Pierre, G., Michaud, P., (2019). Handbook of Microalgae-based Processes and Products; Chapter 22. Bioactive Polysaccharides from Microalgae

Publication :

Toucheteau, C., Deffains, V., Pierre, G., Gaignard, C., Laroche, C., Michaud, P., Lepine, O., Rihouey, C., Lecerf, D., Arnaudin, I., Bridiau, N., Maugard, T., Role of uronic acid in EPS of microalgae to stimulate the production of collagen and hyaluronic acid by human dermal fibroblasts. **A soumettre.**

Communication par posters :

Fourth edition Meeting BENEFIQ du 2 au 4 octobre 2018, Québec, Canada. POLYSALGUE Project : Production of low molecular weight exopolysaccharides from microalgae for nutraceutical application.

Toucheteau C., Gaignard C., Laroche C., Bridiau N., Probert I., Goncalves O., Le Cerf D., Michaud P., Arnaudin-Fruitier I., Maugard T.

« Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous ? Telle est bien la beauté et la noblesse de la science : désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles »

Marie Curie (1867-1934)

Remerciements

*« Le fruit le plus agréable et le plus utile au monde est la reconnaissance. »
Ménandre (342 av. J.-C. – 291 av. J.-C.)*

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (ULR LIENSs, UMR 7266 CNRS) de l'Université de La Rochelle. Je tiens tout d'abord à remercier M. de Viron Olivier, Professeur à l'Université de La Rochelle et directeur du laboratoire LIENSs, de la confiance qu'il a su m'accorder en m'accueillant au sein du laboratoire.

Ce projet a été financé par l'agence nationale de la recherche (ANR) à qui j'adresse mes remerciements pour m'avoir permis de réaliser ce travail.

Je remercie très vivement Mme Ingrid Arnaudin et Mr Thierry Maugard, Professeurs à l'Université de La Rochelle, d'avoir accepté d'être mes directeurs de thèse. Je tiens à vous exprimer toute ma sympathie pour votre rigueur scientifique, vos conseils et votre disponibilité qui m'auront permis d'avancer dans ce projet.

Je remercie Mr Nicolas Bridiau, Maître de conférence à l'Université de La Rochelle, d'avoir joué le rôle d'encadrant scientifique durant ces 3 années de doctorat. Je vous suis reconnaissante pour votre accompagnement, vos conseils et votre rigueur scientifique que vous avez su me transmettre.

Très honorée, je tiens à remercier sincèrement Mme Nathalie Bourgougnon, Mme Sylvia Colliec-Jouault et Mr Philippe Michaud, membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je tiens maintenant à remercier l'ensemble des personnes impliquées dans le projet ANR POLYSALGUE avec Ian Probert et Priscilla Gourvil de la station biologique de Roscoff ; Didier Lecerf, Luc Picton, Tony Varacavoudin, Virginie Dulong et Christophe Rihouey du laboratoire Biopolymères Polymères Surface de Rouen ; Olivier Gonçalves, Dominique Grizeau, Jack Legrand, Jérémy Pruvost et Antoine Descamp du laboratoire Génie des Procédés Environnement et Agroalimentaire de Saint Nazaire ; Philippe Michaud, Céline Laroche, Guillaume Pierre, Cédric Delattre et Clément Gaignard de l'institut Pascal de Clermont-Ferrand et Oliver Lépine de l'entreprise Algosource de Saint Nazaire.

Je remercie vivement Viviane, notre secrétaire pour sa sympathie et son écoute. Tu es comme la maman du laboratoire. Je te souhaite un bon rétablissement et une excellente future retraite. Profites en bien, tu l'as bien mérité.

Remerciements

Je remercie Laetitia, notre gestion financière pour l'ensemble de son travail et sa gentillesse. Ce fut une réelle chance de t'avoir à mes côtés pour gérer tous ces papiers et un soulagement quand tu me disais « je prends le relais ». Bon courage pour la suite je sais que les prochains doctorants auront la même chance que moi.

Je tiens à remercier les autres doctorants du laboratoire LIENSs, Jérémy, Quentin, Sabrina et Julia, je vous souhaite de mener à bien vos projets et que cela soit à la hauteur de vos attentes. Je remercie aussi Rémi, notre chti venant juste de Reims avec qui j'ai partagé mon bureau pendant 2 ans. Merci pour ton écoute, ta bonne humeur et la joie que tu m'as apportée. Evidemment, je ne peux finir que par toi, Justine plutôt surnommée belette, mon binôme de cette aventure. Rien n'aurait été pareil si je ne t'avais pas eu à mes côtés pendant les bons et les mauvais moments. Merci pour ta joie de vivre, pour ton écoute, ton soutien et tout et tout. Je te souhaite évidemment que du bonheur à toi, à ta famille comme tes parents sans oublier celle que tu construis avec William et votre petit Rafaël.

Je remercie l'ensemble des personnes du laboratoire avec Oussama, Florian, Mahéva, Valérie S., Béatrice, Hugo, Romain ainsi que tous les membres de l'équipe BCBS.

Je tiens à remercier les stagiaires qui ont un fait un bout de chemin de ce marathon scientifique. Noémie et Elisa venues durant leur stage de 3^{ème} année de licence, je vous souhaite la réussite que vous espérez. Je termine cette partie évidemment par toi Valentine, qui m'a accompagnée pendant ces deux stages de 6 mois réalisés dans le cadre de son master soit 1 an, ce qui n'est pas négligeable. Tu m'as été d'une grande aide et je ne te remercierai jamais assez pour ton investissement et la qualité de ton travail. Je te souhaite une carrière scientifique fabuleuse.

Je remercie très chaleureusement les membres de ma famille comme ma marraine Isabelle, son mari Jean-Luc et ma filleule Aurore. Je tiens à remercier mes beaux-parents Laurence et Thierry qui m'ont suivis pendant la période si particulière de la rédaction. Je remercie bien évidemment David, avec qui j'espère continuer le chemin de ma vie.

Enfin que serait des remerciements si les personnes les plus importantes de ma vie n'étaient pas mentionnées. Je dédie ces travaux à mes parents, Monique et Henri, sans qui rien n'aurait été possible. Je vous remercie pour votre soutien sans faille durant ce doctorat. Je ne vous remercierai jamais assez pour les valeurs que vous m'avez transmises et qui font de moi la personne que je suis. MERCI.

Table des matières

Introduction générale	17
Etude bibliographique	23
I. Les microalgues	25
I. 1. Classification des microalgues	25
I. 2. Compositions biochimiques des microalgues.....	28
I. 3. Activités biologiques des polysaccharides de la paroi des microalgues et des exopolysaccharides mises en relation avec leurs propriétés structurales.....	38
I. 4. Dans quels secteurs trouvent-on les microalgues ?	49
II. Les méthodes de dépolymérisations des polysaccharides	54
II. 1. La dépolymérisation biologique à l'aide d'enzymes.....	54
II. 2. La dépolymérisation physico-chimique : par rayonnements ou espèces chimiques	55
III. L'activités dermo-cosmétique « anti-âge »	64
III. 1. Histologie de la peau.....	64
III. 2. La matrice extracellulaire.....	72
III. 3. Le vieillissement cutané.....	81
III. 4. Les produits à base de microalgues.....	85
Matériels & Méthodes	89
I. Matériels	91
II. Méthodes	94
II. 1. Dépolymérisation par hydrolyse acide supportée d'EPS de microalgues.....	94
II. 2. Caractérisations biochimiques des EPS du projet	97
II. 3. Evaluation du potentiel anti-âge d'EPS de microalgues	102
Résultats & Discussion	114
<u>Partie 1 : Dépolymérisation d'EPS de microalgues par hydrolyse acide supportée.</u>	106
I. Dépolymérisation par hydrolyse acide supportée d'EPS de microalgues	119
I. 1. Choix de la résine cationique.....	119
I. 2. Développement d'une méthode de suivi des dépolymérisations par SEC-HPLC...	121
I. 3. Dépolymérisation de l'EPS issu de <i>Porphyridium cruentum</i> par hydrolyse acide supportée dans un système batch	123
I. 4. Dépolymérisation des 6 EPS natifs et PTHP par hydrolyse acide supportée dans un système batch	125
I. 5. Dépolymérisation d'EPS de microalgues par hydrolyse acide supportée dans un système circulaire fermé à lit fixe	127
I. 6. Rendement de la méthode de dépolymérisation	129

II. Caractérisations structurales des EPS	130
II. 1. Composition biochimique	130
II. 2. Mesure des M_w et M_n par la triple détection SEC-MALS/DRI/VD.....	133
<u>Partie 2 : Evaluation de l'activité anti-âge d'EPS de microalgues</u>	<u>126</u>
I. Effet des EPS sur la viabilité cellulaire de fibroblastes dermiques humains	141
I. 1. Effet d'EPS de microalgues sur la viabilité cellulaire des fibroblastes dermiques humains 1059 (20 ans) et 1090 (46 ans)	141
I. 2. Effet des EPS sur la mortalité des fibroblastes dermiques humains 1059 (20 ans) et 1090 (46 ans).....	144
II. Stimulation des productions de collagène et d'acide hyaluronique par les fibroblastes dermiques humains	146
II. 1. Effets d'EPS de microalgues sur la production de collagène par les fibroblastes dermiques humains 1059 (20 ans) et 1090 (46 ans).....	146
II. 2. Effets d'EPS de microalgues sur la production d'acide hyaluronique par les fibroblastes dermiques humains 1059 (20 ans) et 1090 (46 ans).....	157
III. Effets d'EPS de microalgues sur les voies de dégradation des composants du derme	166
III. 1. Effets d'EPS de microalgues sur l'inhibition de la métalloprotéase 1 (MMP-1) humaine.....	166
III. 2. Effets d'EPS de microalgues sur l'inhibition de la hyaluronidase de type I bovine	169
Conclusion générale & Perspectives	180
Références bibliographiques	188

Index des figures

Figure 1 : Images microscopiques d'*Arthrospira platensis* (a) ; *Nostoc commune* (b) et *Aphanizomenon flos-aquae* (c)..... 26

Figure 2 : Images microscopiques de *Chlorophyte* (a) et *Euglenophyte* (b)..... 26

Figure 3 : Ultrastructure des cyanobactéries 27

Figure 4 : Ultrastructure de *Rhodophyceae*, microalgue appartenant au premier groupe des eucaryotes..... 28

Figure 5 : Structure de la phycocyanine (A) et de la phycoerythrine 31

Figure 6 : Structure des chlorophylles a et b..... 31

Figure 7 : Structures chimiques des principaux caroténoïdes retrouvés dans les microalgues..... 32

Figure 8 : Structures chimiques du glycogène et de l'amidon (Amylose et Amylopectine) ... 34

Figure 9 : Structures de la cellulose et de l'hémicellulose 35

Figure 10 : Structures biochimiques des deux oligosaccharides identifiés dans la structure de l'exopolysaccharide produit par *Porphyridium* sp..... 38

Figure 11 : Principales activités biologiques exercées par les polysaccharides issus de microalgues. 39

Figure 12 : Diagramme schématique des voies métaboliques proposées pour l'effet anti-inflammatoire de l'EPS *Crypthecodinium cohnii* sur une inflammation induite par le LPS sur des macrophages murins 46

Figure 13 : Secteurs où les microalgues sont présentes. 49

Figure 14 : Représentation graphique d'un champ électromagnétique. 56

Figure 15 : Mécanisme chimique d'une dépolymérisation par rayonnement direct sur le polymère..... 56

Figure 16 : Mécanisme réactionnel de l'hydrolyse acide d'un polysaccharide..... 60

Figure 17 : Histologie de la peau 64

Figure 18 : Les différentes couches de l'épiderme 65

Figure 19 : Types cellulaires présents dans l'épiderme..... 67

Figure 20 : Types cellulaires présents dans l'hypoderme 71

Figure 21 : Vascularisation de la peau 72

Figure 22 : Composants principaux de la matrice extracellulaire du derme..... 73

Figure 23 : Structure biochimique de l'acide hyaluronique 74

Figure 24 : Structure de l'élastine..... 77

Figure 25 : Structures des fibres de collagènes 78

Figure 26 : Facteurs influençant le vieillissement cutané.	81
Figure 27 : Modifications de la peau liées au vieillissement cutané.....	82
Figure 28 : Pénétration des UV dans la peau	84
Figure 29 : Schéma représentant le réacteur discontinu (batch).	95
Figure 30 : Schéma représentant le réacteur circulaire fermé.	96
Figure 31 : Principe du dosage des sucre réducteurs par le DNS.	99
Figure 32 : Mécanisme réactionnel du dosage des grpmt sulfates par le réactif Azure A ...	100
Figure 33 : Réaction entre les liaisons peptiques et Cu ²⁺ du réactif de Gornall.	101
Figure 34 : Mécanisme réactionnel du dosage des acides uroniques.....	102
Figure 35 : Principe du dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase.....	105
Figure 36 : Principe d'un dosage ELISA dit sandwich.	108
Figure 37 : Principe de la réaction enzymatique entre la MMP-1 et le peptide fluorescent.	110
Figure 38 : Taux d'hydrolyse en équivalent sucres réducteurs (%) obtenu par le dosage au DNS après 5 h d'hydrolyse acides en milieu homogène ou hétérogène.....	119
Figure 39 : Profils chromatographiques obtenus avec la méthode SEC-HPLC.....	122
Figure 40 : Suivi de la dépolymérisation en batch de l'EPS de <i>Porphyridium cruentum</i> natif par SEC-RID (A) et évolution du poids moléculaire moyen durant l'hydrolyse en batch (B)....	123
Figure 41 : Suivi de la dépolymérisation en batch de l'EPS PTHP de <i>Porphyridium cruentum</i> par SEC-RID (A). Evolution du poids moléculaire moyen durant l'hydrolyse en batch à partir de l'EPS PTHP (trait plein) et de l'EPS Natif (trait pointillé) (B).....	124
Figure 42 : Suivi de la dépolymérisation en continu de l'EPS PTHP de <i>Porphyridium cruentum</i> par SEC-RID (A) et évolution du poids moléculaire moyen durant l'hydrolyse en continu (B).	128
Figure 43 : Rendements de production des EPS DPB et DPC.....	130
Figure 44 : Viabilité cellulaire (%) des fibroblastes dermiques humains 1059 (20 ans) et 1090 (46 ans).....	142
Figure 45 : Effets des EPS sur la libération de LDH (%) par les fibroblastes dermiques humains 1059 (20 ans) et 1090 (46 ans).	145
Figure 46 : Effets des différents EPS issus de <i>Porphyridium cruentum</i> sur la production de collagène par cellule (%).	147
Figure 47 : Effets des différents EPS issus de <i>Chrysotila dentata</i> sur la production de collagène par cellule (%).	148
Figure 48 : Effets des différents EPS issus de <i>Pavlova</i> sp. sur la production de collagène par cellule (%).	149

Figure 49 : Effets des différents EPS issus de *Diacronema* sp. sur la production de collagène par cellule (%). 150

Figure 50 : Effets des différents EPS issus de *Glossomastix* sp. sur la production de collagène par cellule (%). 151

Figure 51 : Effets des différents EPS issus de *Phaeodactylum tricornutum* sur la production de collagène par cellule (%). 151

Figure 52 : Effets des différents EPS issus de *Synechococcus* sp. sur la production de collagène par cellule (%). 152

Figure 53 : Analyse en composante principale (Sigma plot) des productions de collagènes et des éléments structuraux des EPS. 154

Figure 54 : Effets des différents EPS issus de *Porphyridium cruentum* sur la production d’AH extracellulaire par cellule (%). 157

Figure 55 : Effets des différents EPS issus de *Chrysolita dentata* sur la production d’AH extracellulaire par cellule (%). 158

Figure 56 : Effets des différents EPS issus de *Pavlova* sp. sur la production d’AH extracellulaire par cellule (%). 159

Figure 57 : Effets des différents EPS issus de *Diacronema* sp. sur la production d’AH extracellulaire par cellule (%). 160

Figure 58 : Effets des différents EPS issus de *Glossomastix* sp. sur la production d’AH extracellulaire par cellule (%). 160

Figure 59 : Effets des différents EPS issus de *Phaeodactylum tricornutum* sur la production d’AH extracellulaire par cellule (%). 161

Figure 60 : Effets des différents EPS issus de *Synechococcus* sp. sur la production d’AH extracellulaire par cellule (%). 162

Figure 61 : Analyse en composante principale (Sigma plot) des productions d’acide hyaluronique et des éléments structuraux des EPS. 163

Figure 62 : Effets des différents EPS et du Piroxicam sur l’activité de la MMP-1 humaine. 166

Figure 63 : Analyse en composante principale (Sigma plot) des inhibitions de la MMP-1 et des éléments structuraux des EPS. 168

Figure 64 : Effets des différents EPS et de l’héparine sur l’activité de la HYAL-1 bovine. . 169

Figure 65 : Analyse en composante principale (Sigma plot) des inhibitions de la HYAL de type I bovine et des éléments structuraux des EPS. 170

Figure 66 : Niveau d'expression des gènes impliqués dans la synthèse et la dégradation du collagène après une exposition des fibroblastes 1059 à l'EPS DPB issu de *Glossomastix* sp. (100 µg/ml) pendant 48 h (N : 1)..... 173

Figure 67 : Niveau d'expression des gènes impliqués dans la synthèse et la dégradation du collagène après une exposition des fibroblastes 1059 à l'EPS DPB issu de *Synechococcus* sp. (100 µg/ml) pendant 48 h (N : 2). 174

Figure 68 : Représentation schématique et simplifiée de la voie du TGF- β1 associée aux protéines SMADs avec le possible effet des EPS DPB issus de *Glossomastix* sp. et *Synechococcus* sp..... 175

Figure 69 : Effets des EPS sur la concentration en collagène du derme..... 176

Figure 70 : Effets des EPS sur la concentration en acide hyaluronique..... 177

Index des tableaux

Tableau 1 : Quelques exemples de compositions biochimiques de microalgues	29
Tableau 2 : Quelques exemples de compositions monosaccharidiques et uroniques de polysaccharides de microalgues	35
Tableau 3 : Exemples de diversité dans la composition monosaccharidiques de polysaccharides issus d'une même espèce de <i>Chlorella vulgaris</i>	36
Tableau 4 : Exemples de compositions d'EPS en monosaccharides et acides uroniques.	37
Tableau 5 : Composition monosaccharidique obtenue en chromatographie ionique des EPS du projet.....	92
Tableau 6 : Capacité d'échange d'ions des résines cationiques fortes.	93
Tableau 7 : Caractérisations des colonnes de gel-perméation.	93
Tableau 8 : Séquences des amorces humaines sélectionnées.	109
Tableau 9: M_w obtenue au cours des dépolymérisations des EPS natifs et PTHP.....	125
Tableau 10 : M_w obtenus après 24 h, 48 h et 72 h d'hydrolyse acide supportée à l'aide d'un montage circulaire fermé.....	129
Tableau 11 : Taux de groupements sulfates, de protéines et d'acide uronique des EPS natifs et dépolymérisés dans les systèmes batch et circulaire fermé.....	131
Tableau 12 : M_w , M_n et I déterminés par la méthode SEC-MALS/RID/VD.	134
Tableau 13: Gènes choisis pour l'étude des mécanismes d'action des EPS DPB issus de <i>Glossomastix</i> sp. et <i>Synechococcus</i> sp. sur la production de collagène.	172
Tableau 14 : EPS les plus intéressants suivant les tests biologiques effectués.....	178

Liste des abréviations et des unités.

Abréviations :

α : Alpha	I : Indice de polydispersité
β : Beta	IC₅₀ : Concentration inhibant 50 % de l'activité
γ : Gamma	IFV-A : Influenzavirus A
ADN : acide désoxyribonucléique	IgG : Immunoglobuline G
AH : acide hyaluronique	IgM : Immunoglobuline M
Ara : Arabinose	IL-6 : Interleukine 6
BSA : Albumine de sérum bovin	INF-γ : Interféron gamma
Ca : Calcium	iNOS : Oxyde nitrate synthase
CaCl₂ : Chlorure de calcium	INT : Chlorure d'iodotétrazolium
CO₂ : Dioxyde de carbone	JNK : N-terminal de c-jun
DMSO : Diméthyle sulfoxyde	LDH : Lactate déshydrogénase
DNS : 3,5-DiNitroSalicylate	LiCl : Chlorure de lithium
DPB : Dépolymérisation en batch	LiNO₃ : Nitrate de lithium
DPC : Dépolymérisation en circulaire fermé	LPS : Lipopolysaccharide
EBP : Protéine de liaison à l'élastine	M_n : Masse moyenne en nombre
EC₅₀ : Concentration efficace médiane	M_w : Masse moléculaire moyenne en poids
EMEM : Eagle's Minimum Essential Medium	MALS : Diffuseur de lumière multi-angle
EPS : Exopolysaccharide(s)	Man : Mannose
Fe²⁺ : Fer ferreux	MAPK : Protéine kinase activée par un mitogène
Fe³⁺ : Fer ferrique	meq : Milliéquivalent
Fuc : Fucose	m-HDP : meta-hydroxydiphényle
GAG : Glycoaminoglycane	MMP : Métalloprotéases
Gal : Galactose	MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
Gal A : Acide galacturonique	NAD⁺ : Nicotiamide adénide dinucléotide oxydé
Glc : Glucose	NADH : Nicotiamide adénide dinucléotide réduit
Glc A : Acide glucuronique	NaOH : Hydroxyde de sodium
H⁺ : Proton	NF-κB : Facteur nucléaire kappa-B
H₂O : Eau	NK : Cellules tueuses naturelles
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène	NO : Monoxyde d'azote
HPLC : Chromatographie liquide haute performance	Nrf2 : Nuclear factor erythroid-2-related factor 2
HSV-1 : Virus 1 de l'herpès simplex	PAI-1 : Inhibiteur du uPA
HSV-2 : Virus 2 de l'herpès simplex	PBS : tampon phosphate salin
HYAL : Hyaluronidase	PSM : poste de sécurité microbiologique

Liste des abréviations et des unités

PTHP : Prétraitement par haute pression
Rha : Rhamnose
Rib : Ribose
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
SP-Ca : Spirulan de calcium
SP-Na : Spirulan de sodium
SVF : Sérum de veau foetal
t₀ : temps initial
TGF-β : Facteur de croissance transformant β

TIMP : Tissue inhibitor of metalloprotéines
TiO₂ : Dioxyde de titane
tPA : activateur tissulaire du plasminogène
uPA : activateur du plasminogène de type urokinase
UV : Ultraviolet
VD : Viscosimètre
v_i : Vitesse initiale
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
Xyl : Xylose

Unités :

λ : Longueur d'onde
% : Pourcentage
°C : degrés Celsius
Da : Dalton
g : gramme
μg : Microgramme
h : heure
Hz : Hertz
kBars : KiloBars

kDa : Kilo Dalton
l : Litre
M : Molaire
m² : Mètre carré
min : Minute
μM : Micromètre
nm : Nanomètre
t : temps

***Introduction
générale***

Cette thèse s'est déroulée au sein de l'équipe Biotechnologies et Chimie des Bioressources pour la santé (BCBS) du laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) qui est l'unité mixte de recherche 7266 CNRS LIENSs située à La Rochelle (17).

Elle s'inscrit dans le **projet POLYSALGUE** financé par l'agence nationale de la recherche (ANR). Ce projet unit cinq laboratoires : l'Institut Pascal de Clermont-Ferrand (63) qui est le laboratoire porteur de ce programme, la station biologique de Roscoff (29), le laboratoire Polymères Biopolymères Surface situé à Rouen (76), le laboratoire du Génie des Procédés-Environnement-Agroalimentaire de Saint Nazaire (44), le LIENSs de La Rochelle (17) et l'entreprise Algosource située à Saint Nazaire (44). L'objectif global de ce projet est de découvrir de nouvelles espèces de microalgues productrices d'exopolysaccharides et de les valoriser par la recherche de propriétés rhéologiques et d'activités biologiques intéressantes.

La production mondiale des microalgues est axée sur quelques espèces et peut atteindre des milliers de tonnes par an. Par exemple, *Arthrospira platensis*, aussi connue sous le nom de Spiruline et *Chlorella* sp. sont respectivement produites à hauteur de 3000 et 2000 tonnes par an¹. Il est à noter que 30 % de cette production sont destinés à l'alimentation animale et aquicole². Hormis *Arthrospira platensis*, peu de microalgues sont cultivées pour l'alimentation animale pour deux raisons. Premièrement, beaucoup d'espèces contiennent de la cellulose les rendant difficile à digérer et deuxièmement, seulement 3 sont actuellement recensées dans le catalogue novel food qui autorise les espèces pour l'alimentation humaine. Les principaux producteurs sont l'Asie avec 49 % de la production dont 23 % effectués en Chine, suivi par les Etats-Unis avec 24 % et de l'union européenne produisant 20 % des microalgues³. En plus de l'alimentation animale et humaine, elles sont utilisées dans l'aquaculture, les compléments alimentaires mais aussi en tant que fertilisant, alternative aux énergies fossiles avec le développement d'une 3^{ème} génération de carburant, ainsi que la confection de bioplastiques.

Depuis de nombreuses années, les microalgues ont suscité une attention particulière car elles contiennent des **biomolécules d'intérêt** comme des protéines, des lipides, des polysaccharides mais aussi des pigments et des vitamines. D'autre part, certaines microalgues sont capables de produire des **exopolysaccharides (EPS)**. Ce sont des polysaccharides linéaires ou ramifiés libérés par la microalgue dans le milieu extérieur sans garder de lien structural avec celle-ci (Xiao and Zheng, 2016). Dans la littérature, peu d'études s'intéressent à ces EPS issus

¹ Planetoscope.com ; production mondiale de microalgue ; consulté le 21 août 2019.

² Inovasource.com (consulté le 21 août 2019).

³ Rapport réalisé par D&Consultants, région Bretagne, 2017.

de microalgues comparativement à ceux produits par les autres microorganismes comme les bactéries. Néanmoins, ces EPS microalguaux possèdent de nombreuses activités biologiques comme des propriétés antioxydantes (Tannin-Spitz et al., 2005), immunomodulatrices (Yim et al., 2007) ou bien encore antivirales (Santoyo et al., 2012).

Dans le cadre du projet ANR POLYSALGUE, la thèse de Clément Gaignard (Gaignard, 2019) réalisée à l'Institut Pascal de Clermont Ferrand, a permis de mettre en évidence 6 nouvelles souches de microalgues ayant la capacité de produire des EPS dans le milieu extérieur. Ces souches provenant de la station biologique de Roscoff sont : *Glossomastix* sp. 3707 ; *Chrysotila dentata* CCAP 904/1 ; *Pavlova* sp. 3438 ; *Diacronema* sp. 3514, *Phaeodactylum tricornutum* 4633 et *Synechococcus* sp. 2380. De plus, l'EPS issu de *Porphyridium cruentum* fourni par l'entreprise Algosource fait également l'objet de cette étude comme EPS modèle dont la structure est partiellement connue dans la littérature (Geresh et al., 2002; Heaney-Kieras and J. Chapman, 1976).

Les objectifs de mes travaux sont, dans un premier temps de mettre en place un protocole de dépolymérisation d'EPS issus de microalgues par hydrolyse acide supportée et de les caractériser biochimiquement. Dans un second temps, l'objectif est d'évaluer le potentiel anti-âge de ces biopolymères.

Le marché mondial des cosmétiques était estimé à 401 milliards d'euros en 2016 dont les principaux consommateurs sont l'Europe avec 83 milliards d'euros, les Etats-Unis avec 76 milliards d'euros puis la Chine avec 45 milliards d'euros⁴. Dans ce domaine, un nouveau terme est apparu faisant écho à la nutraceutique. Il s'agit des « cosméceutiques » c'est-à-dire des produits présentant des avantages médicaux sans être pour autant des médicaments⁵.

La méfiance des consommateurs vis-à-vis des produits chimiques étant en augmentation, ces derniers ont tendance à se tourner vers des produits d'origine naturelle. De plus, les apparences physiques et esthétiques représentent un enjeu important dans nos sociétés et les consommateurs recherchent des produits faisant par exemple disparaître les signes de l'âge comme les rides. La biomasse des microalgues ainsi que les EPS qu'elles produisent, de par leur origine naturelle, sont une source intéressante d'actifs anti-âges. Elles sont actuellement retrouvées dans certaines formulations cosmétiques ayant des propriétés hydratantes, raffermissantes ou bien anti-rougeurs. C'est le cas de la crème de nuit concentrée par Garancia®

⁴ Cosmteic-valley

⁵ US. Food and drug.

contenant un extrait de *Chlorella vulgaris* et qui induit des effets anti-rougeur et anti-âge. La crème du Jardin Marin par Algologie® ayant des activités hydratantes, nourrissantes et protectrices est composée, en outre, d'un extrait de *Porphyridium cruentum*.

C'est dans ce contexte que ce travail s'inscrit et se décompose en trois parties :

- Tout d'abord, une étude bibliographique présentera, dans un premier temps les microalgues d'un point de vue biochimique, recensera leurs activités biologiques et les secteurs où les retrouver. La deuxième partie de cette étude aura pour objectif de recenser les différentes méthodes existantes pour réduire la taille des biopolymères. Enfin, la troisième et dernière partie de cet état de l'art présentera les différentes parties de la peau d'un point de vue histologique et biochimique et se terminera par les produits dermo-cosmétiques à base de microalgues.

A la suite de cette étude bibliographique, les matériels & méthodes utilisés et/ ou développés durant cette thèse seront détaillés et les résultats de ces travaux seront exposés en deux parties :

- La première partie sera consacrée à la dépolymérisation d'EPS de microalgues par une méthode utilisant une résine cationique forte à l'aide des systèmes discontinus (batch) et circulaire fermé à lit fixe. Ces EPS seront caractérisés en terme de poids moléculaire mais aussi en terme de compositions biochimiques afin de potentiellement établir une relation entre la structure des EPS et les activités biologiques.
- La seconde partie de ces résultats présentera les effets des différents EPS sur des activités biologiques regroupées dans un axe anti-âge. La viabilité ainsi que la mortalité cellulaire de deux lignées de fibroblastes dermiques humains seront évaluées après traitement aux différents EPS. Puis l'effet des EPS sur les productions de collagène et d'acide hyaluronique seront présentés et discutés. Des cinétiques enzymatiques ciblant des enzymes dégradant le collagène et l'acide hyaluronique seront aussi présentés et discutés. Enfin, une analyse des transcrits sera présentée pour étudier les effets de certains EPS sur des voies métaboliques impliquées dans la synthèse et la dégradation du collagène.

Ce mémoire se terminera par les conclusions de ces travaux ainsi que les futures perspectives pouvant être envisagées à la suite de cette thèse.

*Etude
bibliographique*

I. Les microalgues

Les microalgues, aussi appelées phytoplancton, sont des organismes microscopiques dont la taille est comprise entre 1 et 100 µm (Cheng & Ogden, 2011). Ce sont des microorganismes unicellulaires eucaryotes à la base de la chaîne alimentaire dans le milieu marin (Stephenson & al. 2011). Dans le langage courant, le terme microalgue regroupe aussi les cyanobactéries qui sont des microorganismes photosynthétiques procaryotes. Cependant, les cyanobactéries constituent un groupe phylogénétique à part entière. Les microalgues et les cyanobactéries se développent grâce à la photosynthèse en convertissant l'énergie lumineuse en énergie chimique en utilisant le dioxyde de carbone (CO₂) comme source de carbone pour former des hydrates de carbones indispensables à la vie. Actuellement, 35 000 espèces de microalgues ont été décrites (Cheng & Ogden, 2011). Elles peuvent vivre isolées ou de manière organisée, en filaments ou en colonies. De par cette importante diversité et leur grande faculté d'adaptation, elles sont présentes sur l'ensemble des surfaces de la Terre, des océans aux glaces arctiques, en passant par les lacs hyper-salés et les murs des maisons.

I. 1. Classification des microalgues

La classification des microalgues est en constante révision du fait des nouvelles recherches réalisées dans le domaine de la génétique. Elles peuvent être classées de différentes façons comme par exemple, en fonction de leur couleur ou de leur morphologie. La classification selon la couleur fournit 4 familles de microalgues : les vertes, les rouges, les bleu-vert et les brune-dorées. La classification selon la morphologie offre deux groupes : celui des procaryotes et celui des eucaryotes. Le premier ensemble regroupe les *Cyanobactéries* et les *Prochlorophytes*. Ce sont des microorganismes bleu-vert classés en 5 ordres : *Chroococcales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales*, *Stigonematales* et *Pleurocapsales*. Les caractéristiques principales des cyanobactéries sont l'absorption rapide et en grande quantité de nutriments et de composés comme le phosphate, puis la production de toxines comme des neurotoxines ou des hépatotoxines. Dans le domaine des biotechnologies, trois cyanobactéries sont principalement utilisées : *Arthrospira (Spirulina) platensis*, *Nostoc commune* et *Aphanizomenon flos-aquae* (Villarruel-López et al., 2017).

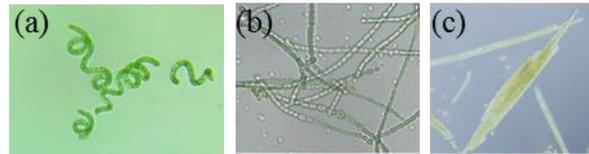


Figure 1 : Images microscopiques d'*Arthrospira platensis* (a) ; *Nostoc commune* (b) et *Aphanizomenon flos-aquae* (c)
(Ughy et al., 2015).

Le deuxième groupe rassemblant les microalgues eucaryotes est composé de différentes divisions : *Chlorophyte* (algue verte), *Euglenophyte*, *Rhodophyte* (algue rouge), *Cryptophyte*, *Dinophyte* ou *Dinoflagelle*, *Prymnesiophyta* ou *Haptophyte*, *Chloroarachniophyte*, etc.



Figure 2 : Images microscopiques de *Chlorophyte* (Algabase) (a) et *Euglenophyte* (Openpub) (b).

I. 1. a. Les « microalgues » procaryotes

Les microalgues procaryotes regroupent les *Cyanobactéries* et les *Prochlorophytes*. Les présences de phycocyanine et de phycoérythrine leurs donnent le surnom d'algues bleu-vert. D'un point de vue structural, ces microalgues sont caractérisées par une paroi cellulaire contenant un peptidoglycane entouré d'une couche externe de lipopolysaccharide servant de mucilage. Le pigment majoritaire est la chlorophylle a. Le glycogène constitue la principale forme de réserve de ces microalgues. Elles ont l'avantage de s'accommoder à tous les habitats. En effet, la présence d'une vacuole gazeuse leur permet de flotter dans les différents espaces marins. D'autres possèdent un filament leur permettant de se déplacer par gliding et ainsi coloniser de nouveaux milieux comme par exemple les roches et les sols.

Les *Prochlorophytes* possèdent certaines différences avec les cyanobactéries. En effet, elles contiennent de la chlorophylle b en plus de la chlorophylle a mais ne contiennent ni de phycobiliprotéine ni de phycobilisome. L'amidon est leur principale réserve énergétique. Les thylakoïdes sont arrangés par paire et sont très rarement seuls dans le cytoplasme. La vacuole gazeuse étant absente, ces microalgues sont retrouvées dans les habitats marins ou vivent en symbiose avec les ascidies (animaux benthiques filtreurs).

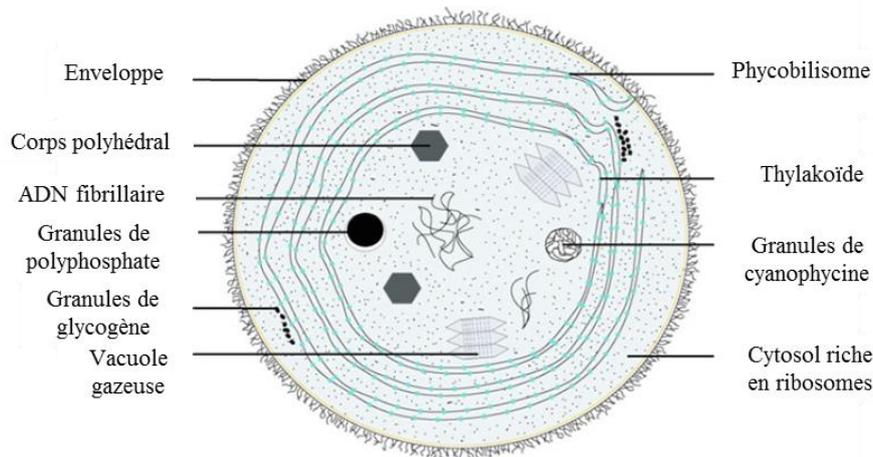


Figure 3 : Ultrastructure des cyanobactéries (Pignolet et al., 2013).

I. 1. b. Les microalgues eucaryotes

Le groupe des microalgues eucaryotes est subdivisé en trois sous-groupes classés en fonction de l'évolution des chloroplastes. Ceux du premier groupe sont entourés de deux membranes. Pour le deuxième groupe, une membrane supplémentaire provenant du réticulum endoplasmique les entourent. Enfin pour le troisième et dernier groupe, les chloroplastes sont entourés par deux membranes supplémentaires.

Le premier ensemble regroupe les *Glaucophytes*, les *Rhodophytes* et les *Chlorophytes*. Ce sont des microalgues rouges et vertes retrouvées dans des régions tempérées et tropicales pour les *Rhodophytes* et dans les eaux froides pour les *Chlorophytes*. Ce sont majoritairement des microalgues multicellulaires ou filamenteuses cependant quelques formes d'unicellulaires existent. D'un point de vue structural, toutes ces microalgues possèdent un flagelle. Pour les *Rhodophytes*, la paroi cellulaire est absente. En revanche pour les *Chlorophytes*, la paroi peut être composée d'une couche microfibreuse de cellulose ou de xylane et d'un mucilage polysaccharidique amorphe comme de l'agar ou du carraghénane (Baudelet et al., 2017). Enfin, au niveau des chloroplastes, ces microalgues contiennent des chlorophylles a, d et b ainsi que d'autres pigments comme les caroténoïdes et les phycobiliprotéines.

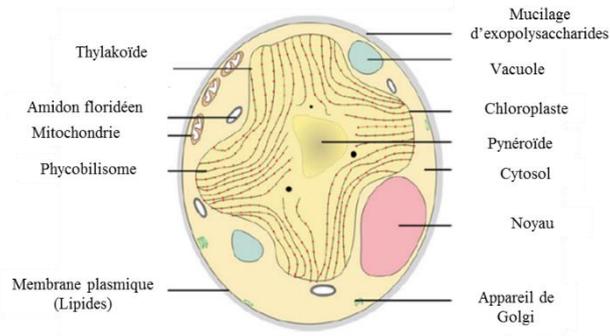


Figure 4 : Ultrastructure de *Rhodophyceae*, microalgue appartenant au premier groupe des eucaryotes (Pignolet et al., 2013).

Le deuxième groupe est formé par les *Dinophytes* et les *Euglenophytes*. La couleur de ces microalgues est variable et la paroi cellulaire est absente. La membrane est entourée de glycocalyx, leur réserve énergétique est l'amidon. Les chloroplastes contiennent les chlorophylles a et c₂ ainsi que des caroténoïdes. Ce sont des microalgues unicellulaires retrouvées dans le plancton marin et les eaux froides. La particularité de ces microalgues est que le noyau contient des chromosomes toujours sous forme condensée.

Le troisième et dernier groupe de microalgues eucaryotes réunit les *Chrysophytes*, les *Prymnesiophytes*, les *Bacillariophytes*, les *Xanthophytes*, les *Eustigmatophytes*, les *Rhaphidophytes* et les *Phaeophytes*. La paroi cellulaire est variable d'une classe à l'autre. En effet, chez les *Chrysophytes*, les *Prymnesiophytes* ainsi que les *Rhaphidophytes* elle est absente alors que chez les *bacillariophytes* cette dernière est composée de silicone. Les chloroplastes sont composés de chlorophylles a, c₁ et c₂ et de caroténoïdes. La plupart de ces microalgues sont unicellulaires. Elles sont présentes dans divers milieux comme le monde aquatique avec les eaux fraîches et le plancton marin mais aussi dans les espaces terrestres avec les sols par exemple (Richmond, 2008).

I. 2. Compositions biochimiques des microalgues

Les microalgues ont suscité un fort intérêt dans le domaine des biotechnologies de par leur capacité à synthétiser diverses macromolécules comme des protéines, des lipides, des pigments et des polysaccharides présents en proportions variables selon les espèces. Le tableau 1 ci-dessous montre quelques exemples de compositions biochimiques de microalgues et illustre l'hétérogénéité des compositions suivant les espèces étudiées.

Tableau 1 : Quelques exemples de compositions biochimiques de microalgues (Becker, 2007).

Microalgues	Protéines (%)	Polysaccharides (%)	Lipides (%)
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Arthrospira platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

I. 2. a. Les protéines synthétisées par les microalgues

Lors d'une croissance stable, le taux protéique représente entre 30 à 55 % du poids sec de la microalgue (Villarruel-López et al., 2017). La composition en acide aminé diffère d'une espèce à une autre. Par exemple, la cyanobactérie *Arthrospira platensis* contient entre 46 et 63 % de protéines dont les acides aminés sont la leucine, la valine, l'isoleucine, la phénylalanine, la tyrosine, la méthionine et la cystéine (Villarruel-López et al., 2017). La microalgue rouge, *Porphyridium cruentum* est quant à elle composée entre 28 et 39 % de protéines contenant entre autre les acides aspartiques et glutamiques, la thréonine et l'alanine. Un autre exemple avec la diatomée *Phaeodactylum tricorutum* qui contient 45 à 54 % de protéines dont 10,3 % de phénylalanine (Villarruel-López et al., 2017).

Actuellement, les protéines de microalgues ne sont pas exploitées de manière purifiée dans l'industrie car à ce jour, les méthodes d'extraction et de purification ne sont pas avantageuses pour les industriels. La biomasse des microalgues riche en protéines est donc directement utilisée dans les domaines de l'alimentation humaine et animale. Par exemple, la cyanobactérie *Arthrospira platensis* (plus connue sous le nom de « spiruline ») est retrouvée dans de nombreux compléments alimentaires ayant entre autres des effets antihypertenseur et anti-hyperlipidique. La microalgue *Chlorella vulgaris* est aussi utilisée comme source alternative de protéines dans l'alimentation porcine. (Bleakley and Hayes, 2017).

I. 2. b. Les lipides produits par les microalgues

Les lipides microalguaux peuvent être classés selon deux catégories basées sur leur polarité. Tout d'abord, les lipides neutres regroupent les acylglycérols (monoacylglycérols, diacylglycérols et triglycérols) ainsi que les acides gras libres. La seconde catégorie est formée par les lipides polaires pouvant être divisés en deux sous-groupes : les glycolipides et les phospholipides (Sajjadi et al., 2018).

Les phospholipides, les glycolipides ainsi que les stérols sont les composants principaux des membranes microalgales. En revanche, les inositols et les sphingolipides sont des produits intermédiaires dans la plupart des voies de signalisation (Borowitzka and Moheimani, 2013). Le rôle des acides gras est variable selon leurs classes lipidiques. Mais en règle générale, les acides gras saturés et monoinsaturés ont un rôle de stockage alors que les acides gras polyinsaturés interviennent dans la structure des microalgues.

Comme les autres macromolécules, la quantité de lipides varie d'une espèce à une autre mais d'autres facteurs peuvent intervenir sur le taux lipidique comme la phase de croissance ou les conditions environnementales (Chen et al., 2018). En effet, les microalgues stockent peu de triglycérides pendant la phase exponentielle de croissance et les accumulent pendant la phase stationnaire. De plus, suite à une exposition trop importante à l'énergie solaire, à de forte température, à un épuisement d'azote ou à une forte salinité, le niveau de triglycérides et la composition en acides gras peuvent être augmentés.

Les lipides issus des microalgues sont actuellement retrouvés dans le domaine de l'alimentation. Ce sont les longues chaînes d'acides gras polyinsaturés ainsi que les pigments caroténoïdes qui sont valorisés par le biais de compléments alimentaires.

Dans le domaine des biocarburants, ces lipides font l'objet de recherche afin de produire du biodiesel qui se définit comme étant des esters mono alkyle d'huile végétale ou d'origine animale. Ce biodiesel est formé par la transestérification des triglycérides en présence d'alcool comme le méthanol et d'un catalyseur approprié conduisant à la formation de glycérol qui est un sous-produit de cette transestérification.

Pour conclure, toutes les microalgues sont potentiellement productrices de lipides mais quatre souches sont actuellement utilisées dans le domaine industriel. Il s'agit de *Botryococcus braunii*, *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus obliquus* contenant respectivement 75 %, 69 %, 58 % et 50 % de lipides (en poids sec) (Pignolet et al., 2013).

I. 2. c. Les pigments présents chez les microalgues

Les microalgues contiennent des pigments qui sont responsables de leurs pigmentations et assurent la photosynthèse. Les pigments sont des complexes de molécules ou de macromolécules ayant la propriété de changer la couleur de la lumière réfléchie ou transmise en fonction de la longueur d'onde d'absorption. On retrouve 3 classes de pigments chez les microalgues : les phycobiliprotéines, les chlorophylles et les caroténoïdes.

La classe des phycobiliprotéines est composée de phycocyanine, phycoérythrine et allophycocyanine. Ce sont des pigments protéiques solubles dans l'eau majoritairement retrouvés chez les cyanobactéries comme les *Rhodophytes* et donnent une couleur bleue ou rouge à la microalgue. Ces pigments sont notamment utilisés en immunologie comme marqueur fluorescent (D'Alessandro and Antoniosi Filho, 2016).

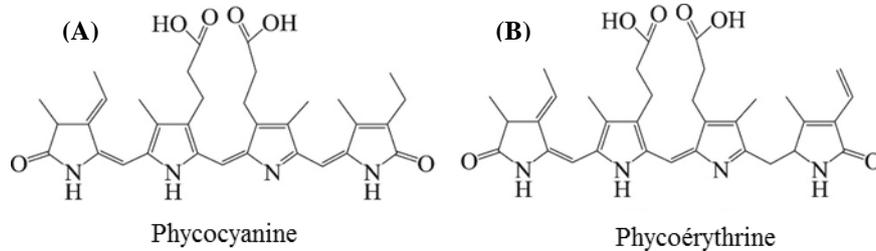


Figure 5 : Structure de la phycocyanine (A) et de la phycoerythrine (B) (D'Alessandro and Antoniosi Filho, 2016).

Le deuxième type de pigment retrouvé chez les microalgues sont les chlorophylles. Ce sont des pigments liposolubles donnant une couleur verdâtre. Chez les microalgues, les chlorophylles a, b et c sont présentes au sein des thylakoïdes, des chloroplastes et participent à la photosynthèse. Il est à noter que toutes les chlorophylles ne sont pas présentes systématiquement chez toutes les microalgues mais la chlorophylle a reste la plus retrouvée (D'Alessandro and Antoniosi Filho, 2016). D'un point de vue structural, ce sont des molécules planes polycycliques estérifiées par une longue chaîne latérale de phytol et contenant un ion magnésium au centre du cycle (Figure 6). Les chlorophylles a et b sont respectivement des pigments bleu/vert et vert/jaune absorbant entre 642 et 665 nm. La chlorophylle c, donnant quant à elle une couleur brune-dorée, est une porphyrine totalement insaturée généralement appelée chlorophyllide (Pignolet et al., 2013).

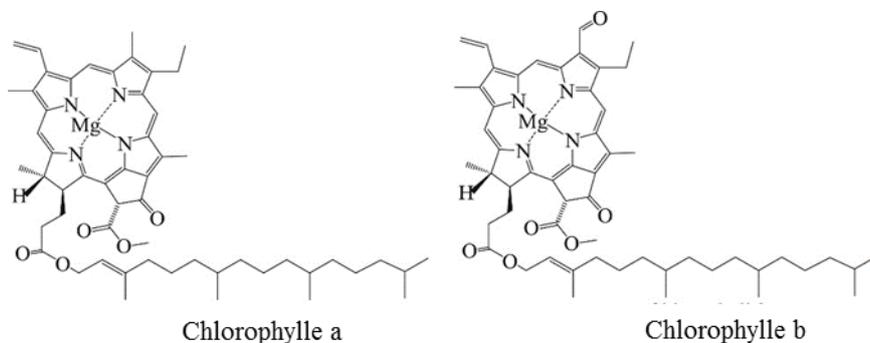


Figure 6 : Structure des chlorophylles a et b (D'Alessandro and Antoniosi Filho, 2016).

Dans le domaine pharmaceutique, les chlorophylles sont utilisées pour leurs activités biologiques comme par exemple leurs propriétés antioxydantes, anticancéreuses et antimutagènes. De par leur ressemblance structurale avec l'hémoglobine, elles stimulent la croissance tissulaire en échangeant le dioxyde de carbone en oxygène (Villarruel-López et al., 2017).

La dernière classe de pigment retrouvée chez les microalgues sont les caroténoïdes. Comme les chlorophylles, ce sont des pigments liposolubles impliqués dans la photosynthèse. En effet ces pigments protègent les systèmes impliqués dans la photosynthèse en enlevant les états les plus énergétiques des chlorophylles résultant d'une absorption excessive de rayonnements lumineux. Cette photoprotection empêche la formation d'espèce réactive de l'oxygène (ROS) leur donnant un fort pouvoir antioxydant. Les caroténoïdes principalement retrouvés chez les microalgues sont les β -carotènes donnant une couleur orange/jaune ; les lutéïnes colorant les microalgues en jaune à faible dose et en rouge/orange à plus forte concentration et les astaxanthine conférant une couleur rosée. La figure 7 montre les différentes structures chimiques des caroténoïdes (D'Alessandro and Antoniosi Filho, 2016).

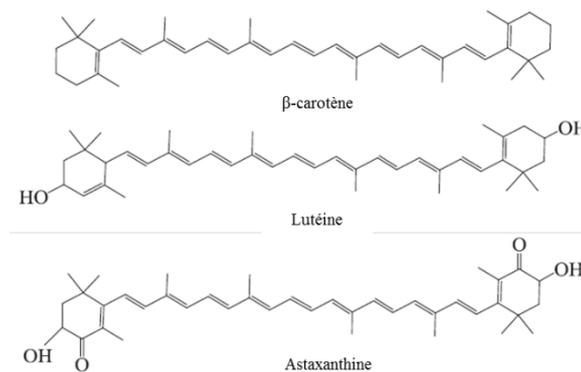


Figure 7 : Structures chimiques des principaux caroténoïdes retrouvés dans les microalgues (D'Alessandro and Antoniosi Filho, 2016).

Les β -carotènes, sont principalement retrouvés dans les compléments alimentaires car ce sont les précurseurs de la vitamine A (rétinol). Ils sont aussi utilisés dans l'alimentation humaine en tant que colorant. L'origine naturelle de ce pigment est de plus en plus demandée car il a été démontré que la forme synthétique ne possède pas les propriétés des formes naturelles. En effet, le β -carotène produit par *Dunaliella salina* induit un taux d'apoptose plus important des cellules issues du cancer de la prostate par rapport à la forme synthétique (Jayappriyan et al., 2013). Cette dernière microalgue est la première source de β -carotène car elle contient 14 % de ce pigment en poids sec correspondant entre 10 à 100 fois à la quantité retrouvée dans les carottes (D'Alessandro and Antoniosi Filho, 2016).

Les astaxanthines sont des dérivés des β -carotènes produits dans des conditions de stress. Ce sont les pigments les plus antioxydants et ils sont employés dans les traitements des maladies cardiaques, le diabète, les troubles de la peau mais aussi dans les maladies inflammatoires chroniques et dans la prévention de cancers. *Haematococcus pluvialis* est capable de les produire à une concentration comprise entre 1 et 8 % en poids sec mais sa culture à grande échelle s'avère complexe et donne une productivité faible la rendant économiquement non viable (D'Alessandro and Antoniosi Filho, 2016).

Les lutéïnes sont des caroténoïdes qui protègent contre les ROS en filtrant la lumière bleue à 500 nm et réduit de 40 % la lumière incidente qui endommage la rétine. Ce pigment est majoritairement utilisé dans le traitement des maladies comme l'athérosclérose, la cataracte, les rétinopathologies liées au diabète et la dégénérescence de la rétine. Plusieurs microalgues produisent ce pigment, cependant seules *Muriellopsis* sp. et *Scenedesmus almeriensis* sont cultivées industriellement, la source principale restant les pétales d'œillets d'inde (D'Alessandro and Antoniosi Filho, 2016).

I. 2. d. Les polysaccharides présents chez les microalgues

Les polysaccharides constituent la dernière famille de macromolécules retrouvés entre 6 à 54 % suivant les espèces (Bernaerts et al., 2019). Ces polymères peuvent être classés en quatre sous parties : les polysaccharides de réserve, les fibrillaires, ceux liés à la paroi cellulaire et les exopolysaccharides.

- **Les polysaccharides servant de source d'énergie**

A ce jour, 5 polysaccharides de stockage ; à savoir l'amidon, l'amidon floridéen, le glycogène, la chrysolaminarine et le paramylon ont été découverts chez différentes espèces de microalgues. Il est à noter que ces polysaccharides ne sont pas retrouvés simultanément chez l'ensemble des espèces. Tous ces polysaccharides sont des enchaînements de glucose lié par différentes liaisons (figure 8). En effet, l'amidon, l'amidon floridéen ainsi que le glycogène ont dans leurs structures des liaisons α -1,4 et α -1,6 alors que la chrysolaminarine possède des liaisons β -1,3 et β -1,6. Le paramylon, quant à lui, contient uniquement des liaisons β -1,3 (Bernaerts et al., 2019).

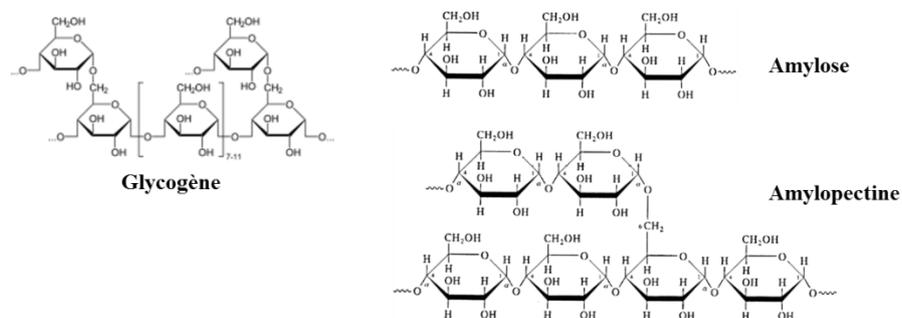


Figure 8 : Structures chimiques du glycogène et de l'amidon (Amylose et Amylopectine) (Source : Wikipédia).

D'un point de vue structural, l'amidon est formé par l'amylopectine, qui est un polymère d' α -D-glucopyranose lié en α -1,4 et ramifié toutes les 12 unités en α -1,6 et par l'amylose, un glucane linéaire lié en α -1,4. Les différences entre l'amidon et l'amidon floridéen sont que ce dernier possède très peu d'amylose (entre 0 et 5 %) contrairement à l'amidon qui en contient environ 20 %. De plus, l'amidon floridéen est présent uniquement chez les microalgues rouges. Enfin, leur localisation est différente car l'amidon est retrouvé dans les chloroplastes alors que l'amidon floridéen est retrouvé dans le cytosol des cellules. Le glycogène ainsi que le paramylon sont, eux aussi, localisés dans le cytosol alors que la chrysolaminarine est présente dans la vacuole des microalgues (Bernaerts et al., 2019; Kusaikin et al., 2010). Il est à noter que le paramylon est présent uniquement chez les microalgues du groupe des *Euglenophyta* (Monfils et al., 2011).

- Les polysaccharides fibrillaires

La phase fibrillaire des polysaccharides est en général formée par les celluloses et hémicelluloses qui sont aussi retrouvées chez les plantes terrestres. L'origine microalgale de ces polysaccharides augmente leur intérêt pour produire du bioéthanol car les microalgues ont la particularité de capter le CO_2 présent dans l'atmosphère (John et al., 2011). D'un point de vue structural (figure 9), la cellulose est un homopolymère linéaire formé par des unités de D-glucose liées en β -1,4 et contient trois groupements hydroxyles en positions 2, 3 et 6 qui sont accessibles pour la conversion des groupements alcools primaires et secondaires (Heinze and Liebert, 2001). En revanche, l'hémicellulose est un hétéropolymère ramifié, formé par des unités de glucose mais aussi de xylose et de mannose par exemple (Wang et al., 2019).

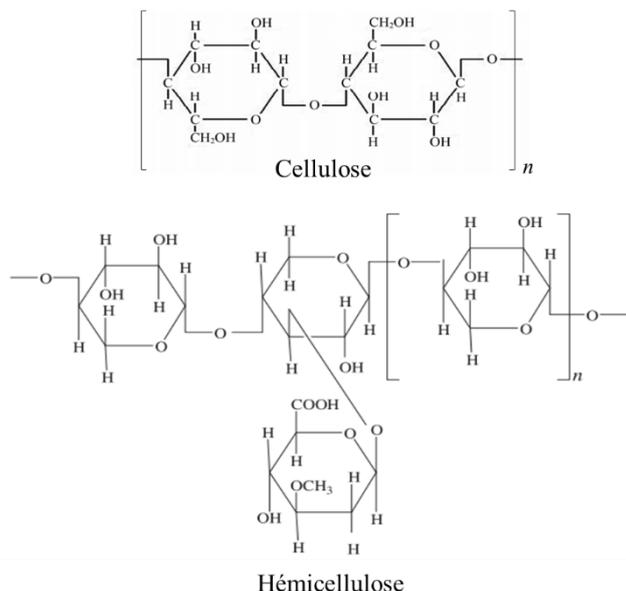


Figure 9 : Structures de la cellulose et de l'hémicellulose (Alam et al., 2014; Richards et al., 2012).

- Les polysaccharides liés à la paroi cellulaire des microalgues

Contrairement aux polysaccharides de stockage, ce sont des hétéropolymères composés de différents monosaccharides, d'acides uroniques et d'acides aminés dont quelques exemples sont illustrés dans le tableau 2. La plupart du temps, ces polymères contiennent aussi des groupements sulfates les rendant intéressants pour des activités biologiques qui seront détaillées dans la partie I.3 de cette étude bibliographique. De plus, il est difficile d'estimer la quantité précise de ces macromolécules due aux difficultés rencontrées pour les extraire (Le Costaouëc et al., 2017).

Tableau 2 : Quelques exemples de compositions monosaccharidiques et uroniques de polysaccharides de microalgues (Bernaerts et al., 2019).

Microalgues	Monosaccharides et acides uroniques (en gras les majoritaires)
<i>Arthrospira platensis</i>	Man, Glc , Gal, Rha, GlcN , GalA, GlcA.
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Man , Glc, Gal, Xyl, Rha, Fuc, Rib, GalA, GlcA .
<i>Porphyridium sp.</i>	Glc, Gal, Xyl , Man, Rha, GlcN, GalA, GlcA .
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Glc , Gal, Xyl, Man, Rha, Fuc, Rib.

Avec : Man : Mannose ; Glc : Glucose ; Gal : Galactose ; Rha : Rhamnose ; Fuc : Fucose ; Rib : Ribose ; Xyl : Xylose ; GlcN : Glucosamine ; GalA : Acide Galacturonique ; GlcA : Acide glucuronique.

La paroi des microalgues procaryotes, comme les cyanobactéries, est principalement composée de peptidoglycane formé par une alternance de N-acétylglucosamine et de N-acétylmuramique liés en β -1,4 (Bernaerts et al., 2019). En revanche, la composition de la paroi des microalgues eucaryotes est plus diversifiée entre les classes et les espèces mais aussi entre les souches d'une même espèce (de Jesus Raposo et al., 2015). Une étude menée par

Blumreisinger M (1983) a montré que trois souches différentes de *Chlorella vulgaris* avaient des compositions monosaccharidiques différentes. Dans le tableau 3 extrait de ces travaux, les trois polysaccharides issus sont tous majoritairement composés de rhamnose mais contiennent des monosaccharides secondaires différents. Par exemple, le polysaccharide issu de la souche *Chlorella vulgaris* 211-11f est composé de 19 % de xylose contre 7 % pour celui issu de la souche *Chlorella vulgaris* K.

Tableau 3 : Exemples de diversité dans la composition monosaccharidiques de polysaccharides issus d'une même espèce de *Chlorella vulgaris* (Blumreisinger et al., 1983).

	Monosaccharides (%)							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Inconnu
<i>Chlorella vulgaris</i> K	47	0	1.6	7.1	1.7	26	3.6	13
<i>Chlorella vulgaris</i> 211-8l	45	0	9.0	19	6.7	18	1.7	<1
<i>Chlorella vulgaris</i> 211-11f	54	<1	6.6	10	5.4	14	<1	9

Avec : Man : Mannose ; Glc : Glucose ; Gal : Galactose ; Rha : Rhamnose ; Fuc : Fucose ; Xyl : Xylose ; Ara : Arabinose

Ces polysaccharides issus des parois de microalgues restent relativement peu étudiés par rapport à ceux des macroalgues car en plus de la difficulté d'extraction, les compositions monosaccharides ainsi que les liaisons très diverses limitent le nombre de recherche. En revanche, de nombreuses activités biologiques ont été découvertes et seront détaillées dans la partie I.3 de cette étude bibliographique.

- Les polysaccharides excrétés dans le milieu : les EPS

Les microalgues excrétant des exopolysaccharides sont en général des cyanobactéries, des diatomées ainsi que des microalgues rouges et vertes (Delattre et al., 2016). La particularité de ces EPS est l'absence de liaison covalente avec la paroi cellulaire. Ils font l'objet d'un nombre plus important d'études par rapport aux polysaccharides liés à la paroi mais restent beaucoup moins étudiés comparativement aux EPS produits par les autres microorganismes comme les bactéries. Leur rôle physiologique est encore incertain mais il semblerait qu'ils permettraient de protéger la microalgue contre la dessiccation (Ramus, 1981) ou lui offriraient une protection mécanique lui permettant de se développer dans un champ environnemental plus étendu (Arad and Levy-Ontman, 2010). En effet, la microalgue *Dunaliella salina* sécrète un EPS lorsqu'elle est cultivée avec une concentration saline importante (Liu et al., 2016).

Tout comme les polysaccharides liés à la paroi, ce sont des polymères dont la composition monosaccharidique est variée. Seul l'EPS produit par *Gyrodinium impudicum* est formé d'un seul monosaccharide, le galactose, de 3 % d'acide uronique et de 10 % de

groupement sulfate (Yim et al., 2007). A ces monosaccharides s'ajoutent des acides uroniques, des protéines ainsi que des groupements sulfates. Le tableau 4 ci-dessous illustre quelques compositions monosaccharidiques d'EPS microalguaux.

Tableau 4 : Exemples de compositions d'EPS en monosaccharides et acides uroniques.

Microalgues	Monosaccharides et acides uroniques	Références
<i>Porphyridium sp.</i>	Xyl, Gal, Glc, GlcA.	(Heaney-Kieras and J. Chapman, 1976)
<i>Rhodella reticulata</i>	Xyl, Glc, Rha, Gal, Man, Rib, GlcA.	(Cohen and Arad, 1998)
<i>Chlorogloeopsis sp.</i>	GalA, Glc, Rha, Gla, Ara, GlcA, Man, Fuc.	(Nicolaus et al., 1999)
<i>Haematococcus lacustris</i>	Man, Gal, Glc.	(Park et al., 2011)

Avec : Man : Mannose ; Glc : Glucose ; Gal : Galactose ; Rha : Rhamnose ; Fuc : Fucose ; Xyl : Xylose ; Ara : Arabinose ; Rib : Ribose ; GlcA : Acide glucuronique ; GalA : Acide galacturonique.

Un des EPS le plus étudié est celui produit par la microalgue rouge *Porphyridium sp.* Il s'agit d'un exopolysaccharide de haut poids moléculaire compris entre 2×10^5 et 4×10^6 Da (Geresh et al., 2002; Patel et al., 2013). Les monosaccharides principalement retrouvés sont le xylose, le glucose et le galactose. La plupart des études montre que le xylose est le monosaccharide majoritaire (Geresh and Arad, 1991; Heaney-Kieras and J. Chapman, 1976). Néanmoins quelques études ont trouvé le galactose comme monosaccharide majoritaire (Patel et al., 2013). Cet EPS est chargé négativement de par la présence de 8 à 10 % d'acides glucuroniques et 7 à 9 % de groupements sulfates (Geresh and Arad, 1991; Heaney-Kieras and J. Chapman, 1976). Des études ont montré la présence d'une glycoprotéine de 66 kDa liée par une N-glycosylation entre l'extrémité N-terminal d'un polypeptide et un résidu mannose de la partie glycane. En terme de répartition de masse, le poids du polypeptide est estimé à 58 kDa et celui de la partie glycane est de 6 kDa. En étudiant la séquence codant pour cette glycoprotéine, des homologues avec des séquences de glycosyltransférases, de pectine lyase liée, de sialidase, et de lectine ainsi que de glucanase de type conA ont été retrouvés. Ceci suggère le potentiel rôle de cette glycoprotéine dans la synthèse et/ou la modification du polysaccharide (Shrestha et al., 2004). Au niveau de la structure osidique de l'EPS, quelques méthylations ont été retrouvées sur des monosaccharides comme des 3-O-methyl-xylose ; 3-O-methyl- et 4-O-methyl-galactose ainsi qu'une O-méthylation au niveau de l'acide glucuronique (Percival and Foyle, 1979). Une étude structurale réalisée en RMN couplée à une fragmentation au lithium en présence d'éthylènediamine a permis de mettre en évidence la structure de deux oligosaccharides illustrée dans la figure 10. Les types de liaisons retrouvés sont des liaisons β -1,4 et β -1,3 (Gloaguen et al., 2004).

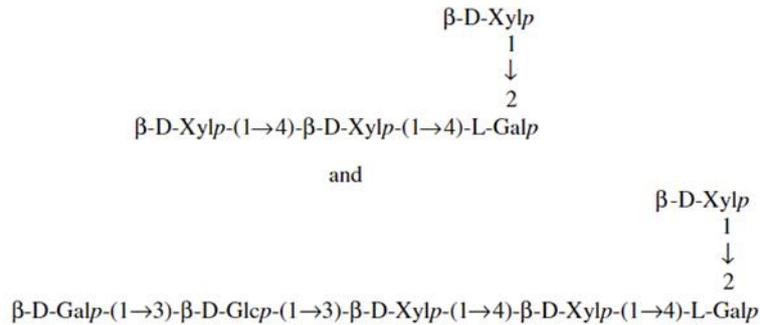


Figure 10: Structures biochimiques des deux oligosaccharides identifiés dans la structure de l'exopolysaccharide produit par *Porphyridium* sp. (Gloaguen et al., 2004).

De manière générale, les EPS sont des molécules de haut poids moléculaire, de l'ordre de 10^6 Da ayant une importante viscosité. Par exemple, l'EPS de *Porphyridium* sp. possède une viscosité proche de celle de la gomme de xanthane le rendant intéressant pour une utilisation en tant qu'agent texturant dans l'industrie alimentaire (Bernaerts et al., 2019).

Tout comme les polysaccharides liés à la paroi cellulaire, des études démontrent que ces polymères exercent de nombreuses activités biologiques qui seront détaillées dans la partie suivante.

I. 3. Activités biologiques des polysaccharides de la paroi des microalgues et des exopolysaccharides mises en relation avec leurs propriétés structurales

Cette partie a servi pour l'élaboration d'un chapitre d'ouvrage consacré aux activités biologiques des polysaccharides issus de microalgues en faisant le lien avec les structures de ces polymères quand les informations dans la littérature le permettaient.

Depuis plusieurs années, les composés bioactifs d'origine naturelle, comme les polysaccharides microalguaux, font l'objet de nombreuses recherches. Les activités biologiques exercées par les polysaccharides microalguaux sont liées à plusieurs facteurs. Le taux de groupement sulfate ainsi que leur position dans la molécule, le poids moléculaire, la composition en monosaccharide et les liaisons formées sont des éléments structuraux pouvant impacter l'effet des polysaccharides sur des activités biologiques. Mais, les connaissances actuelles sur les structures chimiques de ces biomolécules ne permettent pas d'établir avec certitude le ou les éléments impliqués dans l'action observée. En effet, ces polysaccharides sont des polymères complexes dont il est compliqué de caractériser entièrement leurs structures. Les principales activités biologiques exercées par les polysaccharides sont rassemblées dans la figure 11 et seront détaillées en essayant de faire un lien avec leurs structures quand les données dans la littérature le permettront.

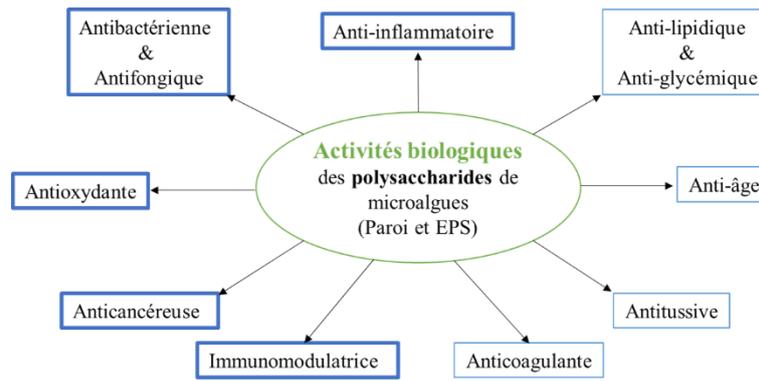


Figure 11 : Principales activités biologiques exercées par les polysaccharides issus de microalgues.

I. 3. a. Activité antioxydante et piégeage des radicaux libres

Dans leur milieu naturel, certaines microalgues comme *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus quadricauda*, se développent en présence de toxines produites par des cyanobactéries. En réponse à ces toxines, ces microalgues augmentent leurs synthèses de polysaccharides intracellulaires et extracellulaires. *In vitro*, ces polysaccharides ont montré une propriété antioxydante contre l'auto-oxydation de l'acide linoléique en l'inhibant de 50 %, à une concentration de 5 mg/ml pour *Scenedesmus quadricauda* et de 12 mg/ml pour *Chlorella vulgaris*. Pour les auteurs, cette différence de dose serait due au pourcentage de groupement sulfate qui est de 3,7 % pour *Scenedesmus quadricauda* contre 2,9 % pour *Chlorella vulgaris* (Mohamed, 2008).

La microalgue rouge *Porphyridium cruentum* secrète un EPS, dont la structure a été évoquée dans une partie précédente, qui exerce une activité antioxydante en inhibant l'auto-oxydation de l'acide linoléique, l'oxydation du fer et en limitant les dommages sur les cellules murines 3T3-L1. Par exemple, cet EPS inhibe de 50 % l'auto-oxydation de l'acide linoléique à une concentration d'environ 2 mg/ml. Ces effets semblent être corrélée au pourcentage de groupement sulfate, comme dans les travaux de Mohamed (2008), mais aussi à la glycoprotéine de 66 kDa connue de cet exopolysaccharide (Tannin-Spitz et al., 2005). Une autre étude s'intéressant à cet exopolysaccharide a étudié l'effet du poids moléculaire sur cette activité. Après une dépolymérisation assistée par micro-onde, le fragment de l'EPS de *Porphyridium cruentum* de 6 kDa exerce une activité antioxydante supérieur aux fragments de tailles plus importante (256 kDa). Néanmoins, le poids moléculaire n'est probablement pas la seule propriété structurale impliquée dans cette activité car ce fragment de 6 kDa contient 17 % de groupement sulfate contre 13 % pour celui de 256 kDa.

La nature du test antioxydant a aussi une importance dans le criblage de l'activité antioxydante. En effet, l'EPS produit par *Graesilla* sp. contenant 11 % de groupement sulfate, n'a aucun impact sur le piégeage des ions superoxydes mais capte les radicaux hydroxyles (Costa et al., 2010; Trabelsi et al., 2016).

Une étude a démontré l'importance de la composition monosaccharidique pour cette activité biologique. Deux souches de *Tetraselmis* sp. ; KCTC 12236BP et KCTC 12432BP produisent deux polysaccharides dont les compositions en monosaccharide sont différentes. La souche KCTC 12236BP produit un polymère contenant du xylose, du rhamnose, du galactose, du glucose et du mannose. Celui produit par la souche KCTC 12432BP est composé de galactose, et de glucose et faiblement de xylose. Seul le polysaccharide issu de KCTC 12236BP et ayant une diversité monosaccharidique plus importante exerce un effet antioxydant (Dogra et al., 2017).

I. 3. b. Activités antibactériennes et antifongiques

La résistance de certaines bactéries et champignons aux antibiotiques normalement utilisés encourage la recherche de nouveaux antibactériens et antifongiques dans les ressources naturelles. Des études s'intéressent aux polysaccharides intracellulaires et excrétés par les microalgues comme source potentielle de nouveaux agents.

C'est le cas de l'EPS produit par la microalgue *Rhodella vulgaris* qui exerce une activité antibactérienne contre des bactéries gram+ comme *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* et *Bacillus cereus*. En revanche cet EPS n'a aucun effet sur les bactéries gram- testées dans l'étude comme *Escherichia colis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Yersinia enterocolitica*. De plus, d'autres EPS produits par des cyanobactéries ont révélé une activité antibactérienne. Par exemple, les EPS produits par *Gloecapsa* sp. ont un potentiel antibactérien aussi bien sur les gram+ et les gram- citées précédemment. Ceux produits par *Synechocystis* sp. ; *Nostoc entophytum* et *N. muscorum* ont, en revanche, une activité uniquement contre *Staphylococcus aureus* (Najdenski et al., 2013). Enfin, l'EPS produit par *Porphyridium cruentum* exerce une activité antimicrobienne contre *Salmonella enteritidis*, une bactérie gram-, et contre des bactéries gram+ comme *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes* (Najdenski et al., 2013; Raposo et al., 2014).

Des études ont aussi mis en évidence une activité antifongique des EPS de microalgues sans établir de relation structure-fonction. Par exemple, l'EPS produit par *Gloecapsa* sp. exerce un effet antifongique contre la levure *Candida albicans* provoquant des infections au niveau

des muqueuses digestives et gynécologiques (Najdenski et al., 2013). Le polysaccharide issu de *Chaetoceros lauderi* possède une activité antifongique contre des champignons dermatophytes comme l'espèce *Microsporum* sp. (Falaise et al., 2016).

I. 3. c. Activité antivirale

Les polysaccharides microalguaux sont intéressants pour les industries biomédicales et pharmaceutiques car ce sont des molécules d'origine naturelle, en général non toxiques, biodégradables et biocompatibles. En revanche, de nombreux polysaccharides présentant une activité antivirale intéressante ne sont pas développés pour des essais cliniques. Les raisons sont probablement que ces molécules de haut poids moléculaire ne pourront pas passer facilement les barrières biologiques. De plus, la plupart des enzymes sont incapables de les digérer, entraînant ainsi leur accumulation dans le corps. Les mécanismes d'actions des polysaccharides sur les virus sont encore mal connus mais il semblerait que ces polymères interviennent à tous les stades de développement des virus comme l'adhésion, la pénétration et la réplication. Prenons quelques exemples de polysaccharides microalguaux ayant une action antivirale.

Le polysaccharide produit par *Chlorella vulgaris* possède une activité contre le virus 1 de l'herpès simplex (HSV-1) en inhibant l'adhésion et la réplication de ce virus avec une IC₅₀ (concentration permettant d'inhiber de 50 % l'effet observé) de 61 µg/ml (Santoyo et al., 2010). Le polysaccharide issu de *Haematococcus pluvialis* agit aussi contre ce virus mais en plus d'intervenir dans l'adhésion et la réplication, il bloque aussi la pénétration à une IC₅₀ de 99 µg/ml (Santoyo et al., 2012).

Les polysaccharides issus des espèces de *Porphyridium* sp. sont aussi intéressants pour cette activité biologique car leurs effets ciblent plusieurs virus. En effet, l'EPS produit par *Porphyridium cruentum* inhibe la pénétration et la réplication des virus 1 et 2 de l'herpès simplex (HSV-1 et HSV-2) et le virus de la vaccine. Les concentrations efficaces médianes (EC₅₀) sont de 34 µg/ml concernant l'effet sur le virus HSV-1 et de 12 µg/ml pour les virus HSV-2 et de la vaccine. Au niveau de la relation structure-fonction, il semblerait que l'activité antivirale soit liée aux pourcentages de groupements sulfates, mais comme tous les effets des polysaccharides, il n'est pas possible d'exclure d'autres paramètres structuraux comme l'emplacement des groupements sulfates dans la molécule ainsi que le poids moléculaire (Raposo et al., 2014). L'EPS produit par *Porphyridium purpureum* agit sur le virus de la vaccine en interagissant avec les particules virales avec une IC₅₀ de 0,65 µg/ml (Radonić et al., 2011). Puis le polysaccharide intracellulaire de *Porphyridium* sp. inhibe l'absorption et la réplication

de HSV-1 et HSV-2 et du virus de la varicelle-zona. Par ailleurs, une étude *in vivo* a permis de démontrer que ce polysaccharide empêche le développement de symptômes après une infection par HSV-1 (Huheihel et al., 2002; Huleihel et al., 2001).

Le polysaccharide issu de la diatomée *Navicula directa* inhibe la pénétration et l'adhésion des virus HSV-1, HSV-2, VIH-1 et les virus grippaux influenza virus A (IFV-A) avec des IC₅₀ comprises entre 7,4 µg/ml pour l'effet contre HSV-2 à 170 µg/ml pour l'IFV-A (Lee et al., 2006).

I. 3. d. Activité anticancéreuse

Les polysaccharides issus de microalgues ont aussi un effet sur la prolifération des cellules tumorales. Des études sur différents modèles cellulaires cancéreux comme les leucémies, les cancers du foie, des adénocarcinomes colorectaux ou bien des tumeurs du sein ont permis de mettre en évidence le potentiel anticancéreux de certains polysaccharides de microalgues.

Par exemple, l'EPS produit par la microalgue *Gymnodinium* sp. , qui est un D-galactane sulfaté contenant un acide lactique au sein de sa structure, exerce un effet cytotoxique sur des cellules de leucémie humaine en induisant l'apoptose sans impacter le cycle cellulaire ni la mitose (Sogawa et al., 1998). Il agit en inhibant les ADN topoisomérases I et II impliquées dans la régulation de la structure topologique de l'ADN (Umemura et al., 2003).

Les polysaccharides extraits de *Tribonema* sp. et *Phaeodactylum tricornutum* réduisent la prolifération de cellules issues du cancer du foie en augmentant l'induction de l'apoptose à faible dose. En effet celui provenant de *Tribonema* sp. augmente l'apoptose de 45 % et 67 % respectivement à 100 et 200 µg/ml. Concernant celui extrait de *Phaeodactylum tricornutum*, l'induction de l'apoptose est de 60 % à 250 µg/ml (Chen et al., 2019; Yang et al., 2019b).

En plus de son activité antioxydante, l'EPS produit par *Porphyridium cruentum* réduit *in vitro* la prolifération des cellules primaires issues d'une tumeur myéloïde induite par le rétrovirus *Graffi*. Cette activité est confirmée *in vivo* en réduisant la croissance d'une tumeur myéloïde *Graffi* et en augmentant la durée de vie des hamsters de 10 à 16 jours (Gardeva et al., 2009).

Les polysaccharides microalguaux sont donc potentiellement une source naturelle d'agent anticancéreux nécessitant des études *in vivo* plus nombreuses. En revanche, peu d'informations sont connues concernant une potentielle relation structure-fonction pour cette activité biologique.

I. 3. e. Activité immunomodulatrice

Les agents immunomodulateurs agissent sur les systèmes immunitaires innés et adaptatifs. La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense contre une infection bactérienne ou une croissance tumorale et joue un rôle important dans le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative. Elle est médiée par des cellules phagocytaires comme les cellules tueuses naturelles (NK) et les macrophages. Une fois activés, les macrophages libèrent du monoxyde d'azote (NO) et des cytokines pro-inflammatoires. Les agents immunomodulateurs tentent d'augmenter cette production de NO et certaines cytokines.

Après une dépolymérisation par ultrasons, différents fragments issus de l'EPS produit par *Porphyridium cruentum*, de poids moléculaire compris entre 6,553 et 1002 kDa, augmentent la production de NO par des macrophages murins (Raw 264.7). Le fragment de 6,553 kDa est le plus actif avec une augmentation de l'activité dose-dépendante. En effet, à 200 µg/ml, le fragment de 6,553 kDa augmente cette production de 5 fois par rapport à des cellules non exposées alors que le fragment de 903 kDa n'a pas d'activité. De plus, la concentration de NO après exposition des macrophages au fragment de 6,553 kDa est de 25 µmol/ml de NO à 200 µg/ml contre 10 µmol/ml de NO à une concentration de 10 µg/ml. En revanche, l'ensemble des fragments produits après la dépolymérisation augmente la production de splénocytes, cellules à l'origine des globules blancs, avec un effet plus important après une exposition avec le plus petit fragment (Sun et al., 2012a).

Le polysaccharide issu de *Haematococcus pluvialis* ayant un poids moléculaire de 23 413 kDa augmente la prolifération de cellules splénocytes mais aussi la prolifération des lymphocytes B dans une gamme de concentration comprise entre 3,9 et 250 µg/ml (Liu et al., 2018).

Une autre étude a mis en avant l'importance du poids moléculaire pour cette activité. Le polysaccharide extrait de *Pavlova viridis* a été dépolymérisé à l'aide d'un système composé de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et d'acide ascorbique couplé aux ultrasons. Les deux fragments obtenus ont des poids moléculaires de 386,99 kDa et 54,99 kDa et un pourcentage de groupement sulfate similaire (15 et 18 %). Les monosaccharides principaux de cet EPS sont le fructose, le glucose et le mannose. Les pourcentages d'acide uronique sont différents avec 8,5 % contenus au niveau du fragment de 54,99 kDa contre 5,9 % dans celui de 386,99 kDa et 3,5 % pour la forme initiale. A une concentration de 100 µg/ml, les 3 formes d'EPS (la forme native et les 2 fragments obtenus par dépolymérisation) stimulent les productions de macrophages

murins et de NO mais le fragment de 54,99 kDa a des effets plus importants (Sun et al., 2016). Ainsi, une diminution de la taille des polysaccharides semble augmenter leur activité immunomodulatrice mais le pourcentage en acide uronique pourrait aussi jouer un rôle dans cette action.

Certains polysaccharides agissent aussi sur la production de cytokines. C'est le cas de l'EPS qui est produit par la microalgue *Thrauchrytriidae* sp. sous une irradiation par des rayons γ . Cet EPS augmente uniquement la prolifération des lymphocytes B (pas les T) de 30 % à une dilution de 10^{-11} après 3 à 4 jours de traitement contribuant ainsi à la réponse immunitaire adaptative. Cet EPS réduit aussi les sécrétions des interleukines 6 (IL-6) et de l'interféron $-\gamma$ (IFN- γ) mais n'a pas d'effet sur la production du facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) par les lymphocytes T. Il est à noter que l'IL-6 est impliquée dans les processus inflammatoires et l'auto-immunité de certaines maladies comme l'athérosclérose, le diabète et l'arthrite rhumatoïde (Zhang and An, 2007). Cet EPS est donc un bon candidat pour des maladies associant une sécrétion excessive d'IL-6 (Park et al., 2017). Dans cette étude, aucune information structurale n'est renseignée sur cet EPS, ne permettant donc pas de faire de relation structure-fonction.

Une autre étude ne mentionnant pas d'information structurale sur le polysaccharide, a montré que le polymère extrait de *Tribonema* sp. augmente la prolifération des macrophages murins et la libération des cytokines IL-6, IL-10 et TNF- α (Chen et al., 2019).

L'EPS produit par *Gyrodinium impudicum* est un polysaccharide de 1870 kDa composé principalement de galactose, d'acides uroniques à hauteur de 2,9 % et de 10,3 % de groupements sulfates. Une étude *in vivo* a permis de démontrer que cet EPS augmente les immunoglobulines M et G (IgM et IgG) ainsi que les cytokines IL-1 β , IL-6 et TNF- α après une seule injection à des mâles souris (modèle C57BL/6) (Yim et al., 2005).

Deux polysaccharides produits par *Chlorella stigmatophora* et *Phaeodactylum tricorutum* exercent des effets différents sur l'activité phagocytaire des macrophages. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que le polysaccharide de *Chlorella stigmatophora* exerce une activité immunosuppressive en réduisant l'activité phagocytaire alors que celui de *Phaeodactylum tricorutum* induit une immunostimulation en activant la phagocytose des macrophages (Guzmán et al., 2003).

Les polysaccharides microalguaux sont donc des agents immunomodulateurs intéressants pour le traitement de certaines maladies. Un complément alimentaire exerçant cette

activité biologique est actuellement commercialisé. Il s'agit du complément alimentaire Immulina® à base du polysaccharide d'*Arthrospira platensis* qui augmente la prolifération des cellules T auxiliaire CD4⁺ induite par *Candida albicans* (Løbner et al., 2008).

I. 3. f. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réponse du système immunitaire pour lutter contre des agents potentiellement délétères comme par exemple les bactéries et les virus. Une réponse inflammatoire excessive et/ou non régulée peut engendrer une absence de réparation des tissus et l'apparition de maladie chronique (Dai et al., 2018). Les polysaccharides de microalgues sont une potentielle source de composés anti-inflammatoires.

Par exemple, l'EPS produit par *Porphyridium cruentum* inhibe la migration des granulocytes, cellules immunitaires impliquées dans l'adhésion et le chimiotactisme durant la phase inflammatoire. A cela s'ajoute, une étude clinique induisant l'inflammation par une résine de balmain du Pérou qui a démontré l'effet inhibiteur de cet EPS et ce dernier serait corrélé à la viscosité du polymère (Matsui et al., 2003).

L'étude démontrant les effets opposés des polysaccharides issus de *Chlorella stigmatophora* et *Phaeodactylum tricornutum* sur l'immunomodulation a aussi analysé le potentiel de ces polysaccharides pour une activité anti-inflammatoire. Cette recherche *in vivo* sur un œdème de patte de rat a mis en évidence les effets anti-inflammatoires de ces deux polysaccharides à des doses de 2,3 et 2,9 mg/kg pour obtenir l'IC₅₀. Le potentiel de ces polysaccharides est d'autant plus intéressant que ces valeurs d'IC₅₀ sont inférieures à la molécule référence, l'indométhacine dont l'IC₅₀ est de 8,6 mg/kg (Guzmán et al., 2003).

Plus récemment, des études ont démontré que certains polysaccharides de microalgues permettaient de réduire l'inflammation induite par le lipopolysaccharide (LPS), un activateur de la production de cytokines et de chimiokines inflammatoires produites par les macrophages et les monocytes.

C'est le cas d'une étude portant sur l'effet du polysaccharide provenant de *Coccomyxa gloeobotrydiformis* sur les voies métaboliques suite à une exposition au LPS. Ce polysaccharide microalgale inhibe l'effet inflammatoire du LPS en empêchant les productions de NO et de prostaglandine E₂ en réduisant les expressions de l'oxyde nitrite synthase (iNOS) et de la cyclooxygénase-2 chez les macrophages murins. De plus, ce polysaccharide supprime l'activation induite par le LPS du facteur nucléaire κB (NF-κB) et la phosphorylation des protéines kinases activées par un mitogène (MAPK) comme p38, les kinases N-terminal de c-

jun (JNK). Puis ce polysaccharide active la voie de signalisation du Nrf2/HO-1 (nuclear factor erythroid 2-related factor/heme oxygenase-1) qui est connu pour inhiber l'inflammation (Dai et al., 2018).

Une autre étude sur l'EPS excrété par *Cryptocodinium cohnii* met aussi en évidence l'effet de ce polymère sur les voies métaboliques impliquées dans l'inflammation induite par le LPS. La figure 12 résume les différentes voies impliquées dans cette activité proposée par les auteurs.

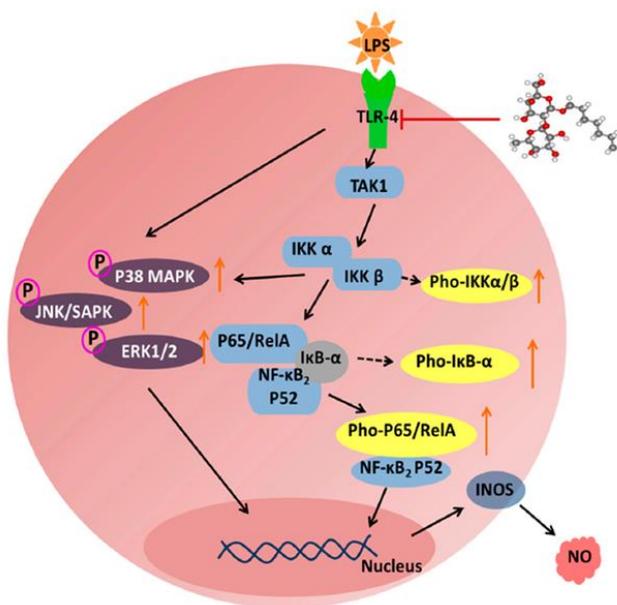


Figure 12 : Diagramme schématisé des voies métaboliques proposées pour l'effet anti-inflammatoire de l'EPS *Cryptocodinium cohnii* sur une inflammation induite par le LPS sur des macrophages murins (Ma et al., 2017).

Ces EPS linéaires de 82,5 kDa réduisent de manière dose dépendante, les productions de NO et de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 β , IFN- γ et le TNF- α sans impacter la cytotoxicité cellulaire. Cette inhibition est induite par différentes voies métaboliques :

- Phosphorylations de p38, ERK et JNK ;
- Expression du récepteur membrane TLR 4 et le facteur de croissance TAK1
- Activation de la voie NF- κ B à travers l'inactivation de l'expression de l'inhibiteur κ B et sa dégradation ainsi que la translocation nucléaire du NF- κ B-P65.

I. 3. g. Activité anticoagulante

Contrairement aux polysaccharides issus des macroalgues qui sont l'objet d'un nombre important d'étude pour des propriétés anticoagulantes (Li et al., 2008; Mestechkina and Shcherbukhin, 2010), seul un polysaccharide provenant d'une microalgue a été découvert pour avoir une activité anticoagulante. Il s'agit du spirulan de calcium (SP-Ca) qui est un

polysaccharide sulfaté isolé de la microalgue bleu-vert *Arthrospira platensis* (Hayakawa et al., 1996). Des études ont démontré que le SP-Ca augmentait de 10 000 fois l'activité antithrombine du cofacteur II de l'héparine. Ce dernier est un inhibiteur de la sérine-protéase plasmatique bien connu pour réduire la coagulation en inhibant la thrombine lorsqu'elle est associée à l'héparine ou au dermatan sulfate. La présence d'un cation divalent comme le calcium ou le sodium est nécessaire pour l'activité de ce polysaccharide. En revanche la nature du cation n'intervient pas sur l'activité. Au niveau du mécanisme d'action, différentes mutations du domaine acide N-terminal du cofacteur II de l'héparine ont permis de mettre en évidence que, contrairement à l'héparine et au dermatan sulfate, le SP-Ca n'interagissait pas avec ce domaine mais avec l'exosite I liant les anions (Hayakawa et al., 2000). De plus, les SP-Ca et SP-Na (spirulan de sodium) améliorent indirectement les activités de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA). En effet, les SP-Ca et SP-Na induisent la sécrétion du uPA et la diminution de la sécrétion de l'inhibiteur du uPA (PAI-1) (Hayakawa et al., 1997; Yamamoto et al., 2003). Dans ce cas précis, ce n'est pas le cation qui est indispensable à cette activité mais les groupements sulfates. Car, après une désulfatation du SP-Na, ce polysaccharide n'inhibe plus l'activité inhibitrice de la sécrétion du PAI-1 ni n'induit la sécrétion du uPA (Yamamoto et al., 2003).

Les polysaccharides de microalgues sont connus pour posséder des groupements sulfates dans leurs structures. Ces derniers sont, en général, à l'origine de l'activité anticoagulante. Ces polysaccharides sont donc de potentielles sources de molécules anticoagulantes mais la difficulté pour les purifier peut être un frein pour développer les recherches dans ce domaine.

I. 3. h. Activité antitussive

Depuis plusieurs années, de nouveaux agents antitussifs comme des alcaloïdes, des flavonoïdes ou des carbohydrates sont apparus. La microalgue unicellulaire rouge d'eau fraîche *Rhodella grisea*, excrète un protéoglycane mucilagineux extracellulaire composé principalement de xylose, de 3-O et 4-O dérivés méthyles (55 %) et d'acide glucuronique (17 %) dont le poids moléculaire est de 800 kDa. Une étude *in vivo* sur des chats non anesthésiés a mis en évidence que ce protéoglycane a un effet sur la toux laryngopharyngée induite mécaniquement mais n'a pas d'effet sur la partie trachéobronchique des muqueuses des voies respiratoires (Nosál'ová et al., 2012). Plus récemment, l'EPS produit par la cyanobactérie d'eau douce *Wolleea saccata* supprime le réflexe de la toux induite par des agents tussigènes chimiques mais cette suppression est inférieure à la codéine, la référence actuellement sur le marché. Cet EPS exerce un effet bronchodilatateur similaire voire supérieur au salbutamol, qui est la

référence sur le marché pharmaceutique. En plus de cela, aucune toxicité ni d'effet secondaire chez les animaux n'ont été rapporté après l'administration de l'EPS (Šutovská et al., 2017).

Ainsi, ces récentes découvertes sont encourageantes pour la recherche d'activités biologiques de ces biopolymères et augmentent le potentiel des microalgues dans le domaine des biotechnologies.

I. 3. i. Activités anti-lipidiques et anti-glycémiques

Peu d'études sur les polysaccharides de microalgues sont actuellement réalisées dans ce domaine d'application. Seul l'EPS produit par *Porphyridium cruentum* a été étudié pour ces activités. Il a été démontré que cet EPS diminue le poids ainsi que les niveaux plasmatiques de cholestérol et de cholécystokines chez le modèle de rat Spargue-Dawley. Des changements morphologiques de l'intestin comme une élongation significative de l'intestin grêle et du colon ont été observés chez les rats recevant l'EPS dans leur régime alimentaire. Ces changements morphologiques seraient probablement dus aux changements métaboliques (Dvir et al., 2000). L'effet anti-lipidique semble être lié à la viscosité de l'EPS de *Porphyridium cruentum* qui limiterait l'absorption des nutriments apportés par l'alimentation (Dvir et al., 2009). Cet EPS aurait aussi un effet anti-glycémique car une diminution des niveaux d'insuline et/ou de glucose a été mesurée chez des rongeurs diabétiques sans induire de changement dans les cellules insulaires pancréatiques ni d'apparition de fibrose ou de nécrose hémorragique (de Jesus Raposo et al., 2015).

I. 3. j. Activité anti-âge

Dans le domaine de la dermo-cosmétique, peu d'études s'intéressent à l'effet des polysaccharides eux même pour l'activité anti-âge. En général, ce sont les biomasses des microalgues qui sont étudiées et utilisées dans des formulations dermo-cosmétiques. Une étude a reporté le potentiel anti-âge de l'EPS produit par *Porphyridium cruentum* comme inhibiteur d'enzymes impliquées dans la dégradation des molécules de matrice extracellulaire. Il a été mis en avant que cet EPS inhibait la hyaluronidase et l'élastase, enzymes hydrolysant respectivement l'acide hyaluronique et l'élastase, dans une gamme de concentration d'EPS comprise entre 0,25 et 2,5 mg/ml. En revanche, cet EPS n'inhibe pas la collagénase issue de *Clostridium histolyticum* qui hydrolyse le collagène, une autre macromolécule de la matrice extracellulaire (Diaz Bayona et al., 2012).

Ainsi cette partie a permis de mettre en évidence le fort potentiel des polysaccharides intracellulaires mais aussi extracellulaires comme actifs biologiques. Les activités recensées

s'intègrent principalement dans les domaines de la pharmaceutique et de la nutrition-santé. En revanche, peu d'études ont mis en évidence des activités dans le domaine de la dermocosmétique.

I. 4. Dans quels secteurs trouve-t-on les microalgues ?

L'intérêt pour les microalgues est grandissant depuis de nombreuses années de par leur richesse en molécules à forte valeur ajoutée. Actuellement elles sont retrouvées dans de nombreux domaines (figure 13) tels que la dermo-cosmétique, l'alimentaire, l'aquaculture, les biocarburants mais aussi la pharmaceutique.

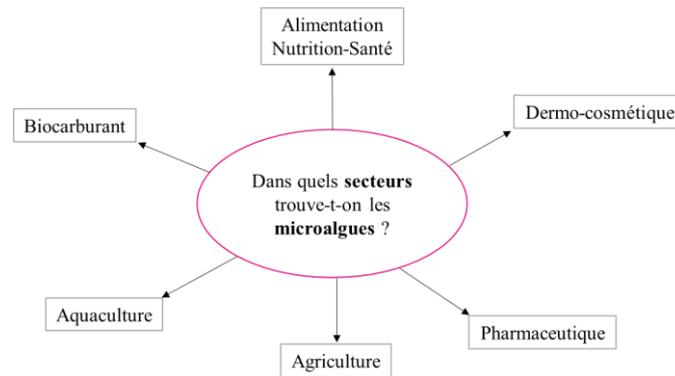


Figure 13 : Secteurs où les microalgues sont présentes.

I. 4. a. Le secteur dermo-cosmétique

La base de données des produits cosmétiques recense environ 120 exemples de produits cosmétiques contenant des ingrédients à base de microalgues. Ces produits aident à maintenir l'intégrité et les propriétés mécaniques de la peau. Sur le marché des cosmétiques, les formulations à base de microalgues permettent de maintenir l'hydratation de la peau, de la protéger contre le photovieillissement, de la blanchir et de stimuler la synthèse ou la réparation des macromolécules de derme comme le collagène et l'acide hyaluronique.

- **Photo-protection de la peau**

Une exposition prolongée aux UV provoque des effets à court et long terme sur la peau. Les effets à court terme, souvent bénéfiques, sont une augmentation de la synthèse de vitamines D et une hausse de la pigmentation de la peau. En revanche les effets à long terme sont négatifs comme le photovieillissement, et la photocarcinogénèse. Les molécules antioxydantes extraites de microalgues sont les mycosporines liées aux acides aminés (MAA) et les caroténoïdes comme l'astaxanthine, le scytonémine et le lycopène (Gangl et al., 2015).

Les mycosporines liées aux acides aminés (MAA) sont des métabolites secondaires produits par les organismes marins (macroalgues, microalgues et cyanobactéries) en condition de stress causé par les UV. Elles ont la capacité d'absorber les radiations UV de 310 à 360 nm évitant ainsi la formation des espèces réactives de l'oxygène. Actuellement, la cyanobactérie *Nostoc* sp. est la seule microalgue connue pour produire ces MAA. Sur le marché, une formulation contenant des MAA issues d'une macroalgue rouge, *Porphyra umbilicalis*, est commercialisée sous les noms de Helionori® et Helioguard 365® par Gelyma.

Les caroténoïdes sont des pigments ayant des propriétés antioxydantes utilisées pour la photo-protection. L'astaxanthine, le scytonémine et le lycopène sont de puissants antioxydants qui peuvent être utilisés dans les crèmes solaires. En effet, le pouvoir antioxydant de l'astaxanthine est 100 fois plus important que l' α -tocophérol. Actuellement, l'astaxanthine, majoritairement produit par *Haematococcus pluvialis* est commercialisé par exemple par Algotonic, sous forme de gélules dont le but est de protéger la peau et les yeux des radiations UV. Le lycopène est retrouvé dans des formulations comme agent anti-âge et les microalgues pourraient en être une source pour ce domaine d'application.

- Agents hydratants de la peau

Maintenir l'hydratation de la peau est essentielle pour assurer son intégrité. Les microalgues produisent différentes molécules comme des polysaccharides, des protéines et des lipides ayant des propriétés hydratantes. *Arthrospina platensis* et *Chlorella* sp. sont riches en protéines et peptides intéressants pour l'hydratation dermique. Les microalgues du genre *Nannochloropsis* sont intéressantes pour leur importante teneur en lipides et plus particulièrement en acide linoléique. Les polysaccharides, présents par exemple dans les microalgues du genre *Chlorella* et *Porphyridium*, sont les molécules qui ont le plus grand potentiel comme produits d'hydratation.

- Le blanchissement de la peau

Dans le domaine cosmétique, la demande de produits blanchissant la peau est en augmentation depuis quelques années. Les effets recherchés de ces formulations sont de diminuer les lentigos (petites taches hyper-pigmentées), le masque de grossesse et les hyperpigmentations résiduelles ou causées par l'utilisation de certains traitements médicaux. La cible de ces produits est la tyrosinase.

Des recherches ont mis en évidence les effets inhibiteurs de molécules issues de microalgues. Par exemple, la zéaxanthine, pigment de la famille des caroténoïdes, produit par

Nannochloopsis oculata, possède une activité anti-tyrosinase, dont un brevet a été déposé afin d'être utilisé dans les crèmes (Ariede et al., 2017). L'astaxanthine possèdent aussi des propriétés blanchissantes en réduisant la production de mélanine de 40 %.

- *Propriétés anti-âge des microalgues*

Le vieillissement cutané est lié à la dégradation des molécules composant la matrice extracellulaire comme le collagène, l'élastine et l'acide hyaluronique. Les cosmétiques actuellement sur le marché réduisent les effets de l'âge sur la peau des consommateurs.

Les extraits de *Monodus* sp., *Thalassiosira* sp., *Chaelocreas* sp. et *Chloococcum* sp. stimulent la production de collagène chez des fibroblastes et kératinocytes humains, et sont soumis à un brevet pour de futures applications (Zanella et al., 2014). L'extrait de *Chlorella vulgaris* stimule aussi la production de collagène, favorise la régénération des tissus et réduit la formation des rides (Ariede et al., 2017). L'extrait de *Phaeodactylum tricornutum* augmente l'activité du protéasome des cellules de la peau comme les fibroblastes, les kératinocytes et les mélanocytes réduisant ainsi l'apparence et/ou la profondeur des rides.

I. 4. b. Le secteur pharmaceutique

De nombreuses études ont montré différentes activités biologiques des microalgues, notamment par les polysaccharides (partie I.3), dans le domaine pharmaceutique. Actuellement peu d'essais cliniques ont été ou sont en cours de réalisation. Ce sont des potentiels anticancéreux qui font l'objet de ces essais. Par exemple, le Dolastatin 10 qui est un petit peptide isolé de la cyanobactérie *Symploca* sp. a été testé en phase I et II d'un essai clinique pour évaluer son activité anti tumeur. Néanmoins, ce dernier a dû être interrompu du fait de la toxicité de ce peptide. Différents analogues au Dolastatin ont été synthétisés. C'est le cas du Soblidotin qui a passé les phases I et II de l'essai clinique et qui est actuellement en phase III. Un cryptophycine, un peptide issu de *Nostoc* sp., et plus particulièrement le cryptophycine 52, a aussi fait l'objet d'un essai clinique pour le traitement du cancer de l'ovaire résistant au platine et pour le cancer des poumons tardifs. Après avoir passé la phase I, l'essai clinique a été interrompu car ce cryptophycine provoquait des neuropathies et des douleurs chez les patients (Dixit and Suseela, 2013).

I. 4. c. Le secteur alimentaire / nutrition-santé

Dans ce domaine, les microalgues doivent apparaître dans des listes comme la liste de novel food. A ce jour, seules 3 microalgues sont inscrites dans ce répertoire. Il s'agit d'*Arthrospira*

platensis, *Chlorella* sp. ainsi que *Odontella aurita* depuis 2014⁶. *Arthrospira platensis* et *Chlorella* sp. sont utilisées dans des compléments et additifs alimentaires pour leurs richesses protéiques. *Odontella aurita* est, quant à elle, valorisée dans ce domaine pour sa richesse en acides gras polyinsaturés comme l'acide eicosapentaénoïque appartenant à la famille des oméga-6 et l'acide docosahexaénoïque faisant partie du groupe des oméga-3. De plus, *Arthrospira platensis* contient 14 % (pourcentage massique) de phycocyanine, qui de par sa couleur bleue, a été autorisée par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) pour être utilisé comme colorant alimentaire (Gangl et al., 2015).

I. 4. d. Le secteur de l'aquaculture

Dans leur milieu naturel, les microalgues faisant partie du phytoplancton sont à la base de la chaîne trophique. Les genres de microalgues principalement retrouvés sont *Skeletonema*, *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, *Tetraselmis*, *Phaeodactylum*, *Monochrysis* et *Isochrysis*. En plus de leurs propriétés nutritives, elles permettent l'équilibre et la qualité de l'environnement de culture (Santini, 2004). Des compléments alimentaires sont aussi utilisés dans certaines cultures. C'est le cas, par exemple, des cultures de crevettes et de saumon qui se servent de l'astaxanthine issue de la microalgue verte *Haematococcus pluvialis* pour donner une couleur rose plus intense à ces crustacés et poissons (Gangl et al., 2015).

I. 4. e. Le secteur de l'agriculture

Dans ce secteur, les microalgues font actuellement l'objet de recherche pour développer de nouveaux biostimulants. Ce sont des microorganismes ou des substances capables de stimuler les mécanismes naturels de la plante afin d'améliorer sa croissance, son efficacité à utiliser des nutriments et accroître sa tolérance vis-à-vis des facteurs de stress abiotiques et biotiques (Chanda et al., 2019). Par exemple, des études ont démontré que le polysaccharide issu d'*Arthrospira platensis* stimulait la croissance des plants de tomates (Farid et al., 2018). Le potentiel des microalgues comme bio pesticide est aussi recherché pour les agricultures biologiques (Costa et al., 2019).

I. 4. f. Le secteur des biocarburants

Le biocarburant à partir de microalgues constitue la 3^{ème} génération. La 1^{ère} génération sert de matières premières issues de cultures vivrières telles que le maïs et le soja. Les biocarburants de 2^{ème} génération sont dérivés d'aliments non comestibles comme le jatropha.

⁶ Centre d'étude et de valorisation des algues, Réglementation algues alimentaire, Synthèse CEVA au 10/02/2014.

Dans les deux cas, la nécessité de grands espaces de culture au détriment de l'alimentation humaine a toujours été le défaut principal de ces alternatives à l'énergie fossile (Chen et al., 2018). Les microalgues font l'objet de recherches afin d'être valorisées pour produire différents biocarburants. En effet, leur richesse lipidique permet de former du biodiesel par transestérification des triglycérides. Ce dernier représente 82 % de la production mondiale de biocarburant assurée par l'Europe, le Brésil et les Etats-Unis (Mata et al., 2010). L'amidon est fermenté en alcool qui est ensuite concentré et hydraté pour former le bioéthanol (Lam and Lee, 2015). Des conditions de culture en anaérobiose de certaines microalgues permettent de générer du méthane qui servira pour produire de la chaleur, de l'électricité ou sera directement inséré dans le réseau de gaz (Cavinato et al., 2017).

De par leur diversité dans leur composition en macromolécules, les microalgues sont donc retrouvées dans un large champ de secteurs industriels aussi bien à faible valeur ajoutée comme l'aquaculture qu'à forte valeur ajoutée comme le domaine pharmaceutique. Néanmoins, des recherches sont encore nécessaires pour voir apparaître de nouveaux produits à base de microalgues dans ces secteurs. En revanche, elles sont actuellement présentes dans de nombreuses formulations dermo-cosmétiques.

Cette première partie a permis de montrer que les microalgues sont des microorganismes riches en macromolécules et notamment en polysaccharides. Les études menées sur ces polysaccharides issus de microalgues ont mis en évidence leurs nombreuses activités biologiques. Leur taille semble être un paramètre important sur les effets biologiques qu'ils induisent. Il est donc intéressant de regarder dans la littérature, les méthodes actuelles pour la réduire.

II. Les méthodes de dépolymérisations des polysaccharides

La dépolymérisation consiste à réduire des polymères en oligomères réduisant ainsi leur taille. Dans le cas des polysaccharides, la dépolymérisation permet aussi de réduire leur viscosité et d'améliorer leur solubilité dans l'eau. Un polymère de taille moins importante aura tendance à mieux interagir avec les voies métaboliques en traversant, par exemple, la membrane plasmique. La dépolymérisation peut être biologique, avec l'utilisation d'enzymes, ou physico-chimiques en se servant par exemple d'irradiations et/ou de composés chimiques comme des acides, des espèces radicalaires ou de l'eau (Laurienzo, 2010).

II. 1. La dépolymérisation biologique à l'aide d'enzymes

Les enzymes sont des protéines qui catalysent des réactions biochimiques spécifiques et qui ne sont pas modifiées en fin de réaction. Elles permettent d'accélérer les catalyses et de diminuer l'énergie d'activation des réactions chimiques. Pour dépolymériser les polysaccharides, les différentes familles d'enzymes couramment utilisées sont les endoglycosidases, comme l'héparanase, et les exoglycosidases (Horn et al., 2012). La différence entre ces deux groupes enzymatiques est l'emplacement des liaisons dans le polysaccharide qu'elles hydrolysent. En effet, les endoglycosidases clivent des liaisons à l'intérieur des polymères alors que les exoglycosidases coupent aux extrémités des polysaccharides (Rollings, 1985). Dans le domaine industriel, les enzymes majoritairement retrouvées sont par exemple, les amylases, les glucanases et les cellulases. De par leur forte spécificité, l'utilisation d'enzymes pour dépolymériser les molécules nécessite de connaître la structure biochimique du polymère. En effet, les enzymes sont des catalyseurs spécifiques pour un type de substrat et de liaison donnés (Rollings, 1985).

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui, en fonction de leur nature, sont plus ou moins sensibles aux variations de température et de pH ainsi qu'à la nature du solvant utilisé. Ces enzymes sont en général fabriquées par des microorganismes ou purifiées à partir de matrices complexes ce qui augmente le coût de cette méthode de dépolymérisation. Les enzymes étant spécifiques à des sites de coupures bien précis, il est nécessaire de connaître la structure primaire du polymère, ce qui n'est pas toujours possible surtout en travaillant avec des polysaccharides de microalgues. Généralement, pour dépolymériser un polymère complexe plusieurs enzymes sont utilisées, ce qui a pour conséquence d'augmenter le coût de cette méthode de dépolymérisation. Les enzymes sont, dans la plupart des cas, mélangées et solubles

dans l'échantillon. Il est donc nécessaire d'inactiver cette dernière en fin de réaction par des méthodes de dénaturation comme en augmentant la température.

Dans une démarche de chimie verte ou chimie durable, de plus en plus souhaitée par les entreprises, les enzymes sont respectueuses de l'environnement les rendant compatibles pour cette initiative (Petit et al., 2007; Trincone, 2019).

Afin de s'affranchir de l'inactivation de l'enzyme en fin de réaction, dans le domaine industriel, elles sont couramment immobilisées afin de les récupérer en fin de réaction et de diminuer ainsi le coût de production. L'immobilisation d'enzymes peut se faire de différentes façons : l'adsorption sur des résines ; fixation sur des supports par l'intermédiaire de liaisons ioniques, covalentes ou par chélation ; l'incorporation dans un gel ou dans des membranes semi-perméables ; l'encapsulation ou inclusion comme dans de la silice ou des fibres. Les méthodes d'immobilisation ont aussi l'avantage de stabiliser les enzymes les rendant plus tolérantes aux variations de température ou de pH par exemple. En revanche, l'activité enzymatique peut être diminuée car des sites actifs peuvent être masqués par l'immobilisation. Pour pallier à cela, la densité enzymatique des enzymes immobilisées est supérieure à la forme libre (Contesini et al., 2013).

Actuellement, les enzymes sont utilisées pour dépolymériser des polymères connus comme par exemple l'amidon, la cellulose ou le chitosane destinés le plus souvent pour des secteurs comme l'alimentation humaine et le biomédical (Trincone, 2019).

II. 2. La dépolymérisation physico-chimique : par rayonnements ou espèces chimiques

La dépolymérisation non biologique a pour grand avantage, dans le cadre de travaux sur de nouveaux polymères, de ne pas nécessiter la connaissance de la structure primaire du polysaccharide. Il existe, actuellement, différentes méthodes non biologiques qui se servent par exemple, de pression élevée, de rayonnements électromagnétiques, d'ultrasons ou d'espèces chimiques.

II. 2. a. Dépolymérisation par haute pression

Actuellement, le traitement par haute pression est retrouvé dans l'industrie pharmaceutique pour la dispersion de solides et dans l'industrie alimentaire pour stabiliser les émulsions et modifier des propriétés de macromolécules (Floury et al., 2002). La pression exercée sur les macromolécules est en général comprise entre 100 MPa et 350 MPa suivant les appareils. Des études ont démontré que ce traitement permet de réduire la viscosité des

solutions, agit sur les propriétés rhéologiques et gélifiantes des composés et permet de réduire la taille des particules sans altérer la structure primaire du polysaccharide (Hu et al., 2013). Par exemple, ce procédé a servi à dépolymériser des polysaccharides comme la cellulose méthylée (Floury et al., 2002) et le chitosane (Kasaai et al., 2003).

II. 2. b. Dépolymérisation à l'aide de rayonnements électromagnétiques

Un rayonnement est une émission d'énergie sous forme d'ondes ou de particules. Le rayonnement électromagnétique est composé d'un champ électrique et d'un champ magnétique qui oscillent perpendiculairement (Figure 14) (Flórez-Fernández et al., 2018). Les ondes électromagnétiques les représentant sont regroupées dans un spectre électromagnétique. Il existe différentes ondes qui classées par fréquences croissantes sont les ondes radios, les micro-ondes, les ondes infrarouges, la lumière visible, les ultraviolets, les rayons X et les rayons gammas.

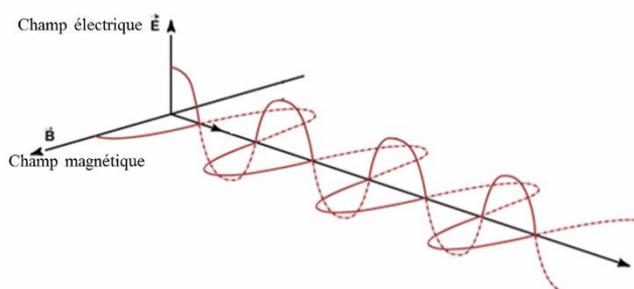


Figure 14 : Représentation graphique d'un champ électromagnétique.

Ces rayonnements peuvent dépolymériser les polysaccharides directement ou indirectement (MacArthur and D'Appolonia, 1984).

Les phénomènes directs sont les ionisations et les excitations des atomes et/ou des molécules du polymère le long des rayonnements électromagnétiques. Les ionisations et les excitations provoquent une augmentation de l'énergie interne du polymère ce qui diminue sa stabilité. L'excédent d'énergie est éliminé par la rupture d'une liaison covalente. La figure ci-dessous représente des exemples de cassure après irradiation.

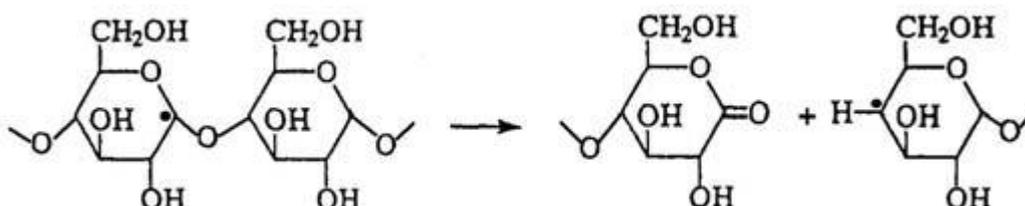


Figure 15 : Mécanisme chimique d'une dépolymérisation par rayonnement direct sur le polymère (Sun, 2017).

Le phénomène indirect d'irradiation se produit dans des solutions aqueuses de polymère. Il s'agit de l'interaction des rayonnements électromagnétiques avec les molécules d'eau. Cette réaction est la radiolyse de l'eau et se décompose en deux étapes. Tout d'abord, l'eau irradiée est ionisée formant de l' $\text{H}_2\text{O}^{+\cdot}$. Rapidement, cette molécule se dissocie pour former des produits moléculaires stables comme HO, H_2O_2 et des radicaux libres comme H^\cdot , OH^\cdot , HO_2 . Les radicaux libres générés interagissent ensuite avec les polymères présents dans la solution aqueuse.

Cette dépolymérisation a pour avantage de réduire les temps de réaction et de ne pas utiliser de substances chimiques ni biologiques permettant ainsi de s'affranchir des étapes de purification en fin de réaction. En revanche, l'utilisation de rayonnement à haute fréquence comme les rayonnements γ augmente le risque pour les manipulateurs. Ce sont des fréquences que la peau n'est pas capable d'arrêter induisant ainsi des dommages cellulaires et moléculaires. Il est donc impératif de protéger les installations ainsi que les manipulateurs avec des équipements spécifiques pour cette méthode.

Les rayonnements électromagnétiques retrouvés dans la littérature pour dépolymériser les polysaccharides sont les micro-ondes, les ultraviolets et les rayons γ .

- Les micro-ondes

Cette dépolymérisation utilise des rayonnements micro-ondes de fréquence comprise entre 3×10^9 Hz et 300×10^9 Hz. Cette méthode permet d'accélérer les réactions chimiques par une montée en température plus rapide et renforce les collisions entre les polymères facilitant ainsi leur clivage (Wu et al., 2010).

Dans le cas des polysaccharides microalguaux, cette méthode a servi dans une étude pour dépolymériser l'EPS de *Porphyridium cruentum*. Cette dépolymérisation se déroule sur des temps courts de l'ordre de 10 min (Sun et al., 2009).

- Les ultraviolets (UV)

Les ultraviolets sont des rayonnements électromagnétiques dont la fréquence est comprise entre 8×10^{14} Hz et 3×10^{16} Hz. En termes de temps, ces rayonnements sont plus efficaces que les ultrasons et les rayons gammas. En effet, pour dépolymériser un alginate et obtenir un polymère d'un poids moléculaire moyen de 10^4 Da, le temps de dépolymérisation n'est que de 5 min à l'aide des UV alors qu'il est de 40 minutes avec des ultrasons, soit 7 fois plus important (Wasikiewicz et al., 2005). La lumière ultraviolette peut être couplée au dioxyde

de titane (TiO₂) permettant de réduire les temps de réactifs déjà courts. De plus ce TiO₂ est stable et ne présente pas de cytotoxicité biologique (Burana-osot et al., 2009).

Cette méthode sert notamment à dépolymériser des alginates et du chitosane.

- Les rayonnements gammas

Les rayonnements gammas ont une fréquence de 3×10^{19} Hz. En plus des avantages communs aux méthodes d'irradiations, ces rayonnements permettent de stériliser l'échantillon. Les polymères dépolymérisés peuvent alors être directement utilisés à des fins biologiques (Flórez-Fernández et al., 2018) mais aussi à des fins alimentaires. En effet, il a été prouvé que les aliments irradiés par les rayonnements gammas sont adaptés pour une consommation humaine (Atrous et al., 2015).

D'un point de vue énergétique, les rayonnements gammas sont plus efficaces que les ultrasons et la lumière ultraviolette (Wasikiewicz et al., 2005). Contrairement aux ondes ultrasonores, la dépolymérisation par les rayonnements gammas ne nécessite pas un contrôle et maintien de la température facilitant ainsi la transposition à l'échelle industrielle.

Ces rayonnements gammas sont utilisés sur des polysaccharides comme les carraghénanes, l'amidon le chitosane et l'acide hyaluronique.

II. 2. c. Dépolymérisation par les ondes ultrasons

L'ultrason est une onde mécanique et élastique se propageant au travers de différents supports solides, liquides, fluides et gazeux. Les ondes ultrasonores ont des fréquences comprises entre 20×10^6 et 100×10^6 Hz et provoquent un phénomène de cavitation. Ce phénomène est la formation et l'effondrement violent de bulles de gaz. Ceci génère des fortes conditions de température (environ 10^4 Kelvins) et de pression (10^3 Bars) ainsi que des forces de cisaillement, des ondes de chocs et des microjets induisant les transformations physiques et chimiques des molécules (Iskhalieva et al., 2012). Les bulles peuvent être de différentes natures comme des gaz dissous ou des vapeurs de liquides volatiles. Ce phénomène de cavitation est extrêmement court, de l'ordre de la microseconde (Kasaai et al., 2008). La création de chaleur lors de cette réaction est un désavantage car les ultrasons sont plus efficaces à de faibles températures. Il est donc nécessaire de maintenir une température basse durant l'ensemble de la réaction (Flórez-Fernández et al., 2018).

Cette méthode peut être combinée à plusieurs autres réactions comme la réaction de Fenton qui dégrade les molécules en utilisant des radicaux OH et des ions ferriques (réaction

de Fenton : $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ (Zhang et al., 2016). D'autres études ont combiné les ultrasons avec des enzymes comme la cellulase afin de dépolymériser de la gomme de guar (Prajapat et al., 2016) ou au peroxyde d'hydrogène pour dépolymériser un exopolysaccharide produit par une bactérie isolée des eaux profondes (Petit et al., 2007).

L'irradiation par ultrasons a aussi été combinée à la méthode du glycol-split sur des héparines (Achour et al., 2013). Cette méthode de glycol-split s'effectue grâce à l'oxydation par le periodate de sodium (NaIO_4) et par la réduction au borohydrure de sodium (NaBH_4). Cette réaction a pour objectif l'ouverture des cycles des monosaccharides. L'oxydation sur les carbones aux positions 2 et 3 donne à cette méthode sa sélectivité (Pisano et al., 2005). Cette dépolymérisation par ultrasons permet de cliver une large gamme de macromolécules comme l'ADN, des polysaccharides comme le dextrane ou l'amidon (Petit et al., 2007).

II. 2. d. Dépolymérisation en présence d'espèce chimique

Cette dépolymérisation se fait par l'ajout d'espèce chimique comme du peroxyde d'hydrogène ou des acides. Contrairement aux méthodes utilisant des ondes, il est nécessaire de purifier les échantillons en fin de réaction (Petit et al., 2007).

- **Dépolymérisation radicalaire**

Elle fait intervenir des radicaux provenant de la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et des cations métalliques. Lorsque les cations utilisés sont les ions ferriques, cette réaction est nommée réaction de Fenton (Vismara et al., 2010). Cette méthode non sélective, clive les molécules sur l'ensemble des positions carbones. Sur des temps de réaction d'environ 12 h, les groupements sulfates sont conservés, ce qui s'avère être un avantage pour certaines activités biologiques comme les propriétés anticoagulantes (Flórez-Fernández et al., 2018).

Cette méthode est utilisée pour dépolymériser des polysaccharides comme des héparines, des chondroïtines sulfates, l'acide hyaluronique, le dermatane sulfate, et des glycosaminoglycanes d'origine marine (Chen et al., 2013; Ofman et al., 1997; Vismara et al., 2010; Zhao et al., 2013).

- **Dépolymérisation dans l'eau ou « auto-hydrolyse »**

L'eau est une espèce ampholyte, c'est-à-dire, que l'eau peut jouer le rôle d'acide ou de base. La dépolymérisation aqueuse utilise cette particularité, générant ainsi une dégradation par oxydo-réduction des polymères (Holme et al., 2003). La dépolymérisation peut se faire à différentes températures. Lorsque l'eau est dans l'état sous-critique ou super-critique, la température de réaction est comprise entre 180 et 240 °C et le temps de réaction est d'environ

10 min pour dégrader un alginate de masse moléculaire initiale de $4,2 \times 10^5$ Da (Aida et al., 2010). En revanche, lorsque la température de l'eau est maintenue à 37°C , la dépolymérisation s'effectue pendant deux semaines et porte le nom d'auto-hydrolyse (Flórez-Fernández et al., 2018).

L'avantage de cette méthode est qu'aucune substance chimique n'est ajoutée en comparaison avec l'hydrolyse acide ou la dépolymérisation radicalaire. Comparativement à la dépolymérisation enzymatique, cette méthode est peu coûteuse ce qui la rend plus accessible (Kelishomi et al., 2016). En revanche lorsque l'eau n'est pas sous ou super-critique, le temps de réaction est plus important ce qui peut être un verrou pour un passage à une échelle industrielle.

Cette méthode est utilisée pour dépolymériser des polysaccharides comme la cellulose, l'amidon, la gomme guar et les alginates.

- Dépolymérisation en milieu acide

La réaction d'hydrolyse consiste à rompre une liaison covalente en utilisant une molécule d'eau.

L'hydrolyse acide des polysaccharides se déroule en trois étapes. Le polysaccharide est hydrolysé en oligosaccharides puis en monosaccharides. Les monosaccharides sont ensuite déshydratés pour former des furfuraux, et des acides carboxyliques. L'efficacité de cette dépolymérisation dépend de la force de l'acide mais aussi du polysaccharide à dégrader. En effet, plus le degré de polymérisation du polysaccharide sera important, plus il sera difficile à hydrolyser. Concernant le mécanisme de cette réaction (Figure 16), l'hypothèse est que cette réaction se décompose en 3 étapes. Tout d'abord, il y a adsorption sur le polysaccharide d'une paire d'électrons ou des groupes hydroxyles. Puis il y a protonation de l'oxygène de la liaison *O*-glycosidique puis insertion d'une molécule d'eau. A la fin de la réaction un proton est libéré (Vilcoq et al., 2014).

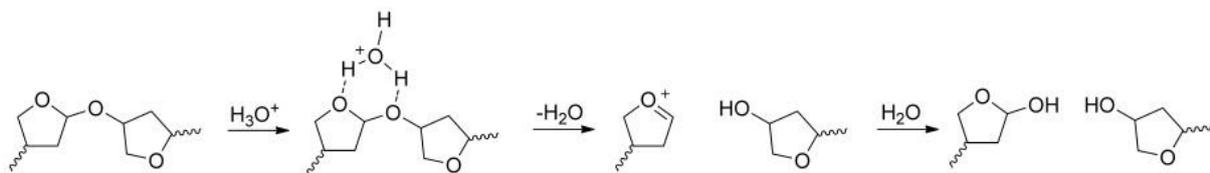


Figure 16 : Mécanisme réactionnel de l'hydrolyse acide d'un polysaccharide (Vilcoq et al., 2014).

Contrairement à la dépolymérisation enzymatique, les hydrolyses acides nécessitent de forte température pour effectuer la réaction. La dégradation enzymatique de la cellulose

requière une énergie d'activation comprise entre 3 et 50 kJ mol⁻¹ alors que l'hydrolyse acide demande une énergie d'activation comprise entre 170 à 180 kJ mol⁻¹. De ce fait, l'hydrolyse enzymatique peut se faire à 50 °C alors que l'hydrolyse acide se fait, en général, à 90 °C.

Les protons, nécessaires pour cette hydrolyse, peuvent être libres dans le milieu réactionnel (catalyse homogène) ou liés à des supports de différentes natures (catalyse hétérogène)

➤ Catalyse acide homogène

Dans cette catalyse, les acides sont sous forme liquide et en solution avec les molécules à dépolymériser. Cette méthode peut se faire à l'aide d'acides minéraux comme par exemple l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide sulfurique (H₂SO₄) et l'acide fluorhydrique (HF) ou avec des acides organiques comme l'acide oxalique (C₂H₂O₄), l'acide maléique (C₄H₄O₄) et l'acide fumarique (C₄H₄O₄). Plusieurs paramètres influencent cette méthode : la nature, l'état et la concentration de l'acide utilisé ainsi que la température de la réaction. Les deux acides couramment utilisés sont l'acide chlorhydrique et l'acide sulfurique. Lorsque les acides sont concentrés, environ 40 à 60 % en poids, des températures faibles sont utilisées aux alentours de 50 °C. En revanche, lorsque les acides sont dilués, la réaction se fait à des températures beaucoup plus importantes (180 °C) afin qu'elle s'effectue en quelques minutes.

L'ajout de sel comme CaCl₂ (Chlorure de calcium) ou LiCl (Chlorure de lithium) permet d'augmenter le pourcentage d'oligosaccharide produit (85 % à 90 °C).

Cette méthode de dépolymérisation est efficace et applicable à de nombreux polysaccharides. Néanmoins, l'utilisation d'acide présente de nombreux inconvénients. Tout d'abord, il est difficile de séparer les résidus d'acide de l'échantillon, ce qui entraîne un faible recyclage du catalyseur et nécessite un traitement des effluents résiduels. De plus, les acides détériorent les réacteurs par le phénomène de corrosion, ce qui est un inconvénient à une échelle industrielle. Les industries veulent s'inscrire dans une démarche de chimie verte et l'utilisation d'acide ne s'inscrit pas dans une approche durable.

➤ Catalyse acide hétérogène

Cette catalyse est principalement retrouvée dans la pétrochimie. Contrairement à la catalyse acide homogène, les acides ne sont pas dissous dans le milieu réactionnel. L'acide est donc facilement séparé de l'échantillon en fin de réaction. Ces supports peuvent être réutilisés en effectuant des étapes de régénération. Le phénomène de corrosion est aussi diminué en présence d'acide immobilisé. Les facteurs importants dans cette catalyse sont la nature et la

porosité des supports car il faut qu'ils soient résistants et de diamètre suffisamment important pour permettre aux macromolécules d'interagir avec les protons immobilisés.

Actuellement, il existe différents supports comme les zéolites, les résines, les oxydes métalliques, les microsphères carbonées, les hétéropolyacides et les supports solides magnétiques.

Les **zéolites** sont des cristaux formés d'un squelette microporeux d'aluminosilicate dont les pores contiennent des protons. L'inconvénient de ce support est le faible diamètre des pores empêchant les macromolécules d'atteindre les cations. Il est donc nécessaire d'effectuer un prétraitement comme la solubilisation de l'échantillon dans des liquides ioniques ou une irradiation aux micro-ondes (Vilcocq et al., 2014).

Les **résines** sont des polymères, majoritairement synthétiques, sous forme de billes. Les polymères organiques sont par exemple du divinylbenzène ou du fluoropolymère. Au sein de leur structure macroréticulaire, se trouve un ion fixé par une liaison covalente au polymère. Un contre-ion établit une liaison ionique avec ce dernier et donne la nature de la résine. Elles sont classées en deux catégories selon la nature du contre-ion échangeable, les cationiques et les anioniques. Les résines sont souvent caractérisées en fonction de leur granulométrie, leur taux de réticulation, leur porosité ainsi que leur capacité d'échange d'ions (Mabrouk, 2012). Les résines cationiques fortes possèdent un groupement sulfonique comme ion fixé et ont un proton en ion échangeable. Ce sont ces résines qui sont les plus utilisées pour dépolymériser les polysaccharides (Vilcocq et al., 2014). Par exemple, l'Amberliste FPC23H, ayant une capacité d'échange d'ions de 2,2 eq/l a servi à réduire la taille d'ulvane (Adrien et al., 2017) et l'Amberlyst 15 (4,7 eq/l) a diminué le poids de la cellulose (Rinaldi et al., 2010). Dans les mêmes conditions de température, les résines sont plus efficaces que les zéolites (Kitano et al., 2009). Leurs propriétés d'adsorptions et d'échangeuses d'ions permettent d'éliminer les impuretés comme les protéines et les fururaux (Vilcocq et al., 2014). L'inconvénient de ce support est qu'il ne résiste pas à des températures supérieures à 130 °C.

Les matériaux mésoporeux contenant des **oxydes métalliques** sont utilisés pour dépolymériser des polysaccharides comme la cellulose. Il possède des pores, dont le diamètre est compris entre 2 et 50 nm. Les métaux utilisés sont par exemple le Niobium (Nb), le Tungstène (W) et le Molybdène (Mo) (Tagusagawa, 2010).

Un autre type de support solide a été développé pour dépolymériser la cellulose. Il s'agit de **microsphères de carbone** riches en groupement sulfonique. Les carbones proviennent du glucose, de la cellulose ou de l'amidon (Honglei, 2016) .

Les **hétéropolyacides** sont aussi un type de support solide. Ils sont composés d'un métal comme le tungstène, le molybdène ou le vanadium, d'oxygène et d'un élément du bloc p du tableau périodique comme le silicium, le phosphore ou l'arsenic et d'un atome d'hydrogène. Ces hétéropolyacides ont la particularité d'être extrêmement stables et d'avoir une forte mobilité protonique. En revanche, ils ne peuvent pas être utilisés comme catalyseur hétérogène dans les solvants polaires. Après séparation de l'échantillon par une extraction avec des solvants organiques, l'hétéropolyacide peut être directement réutilisé (Vilcocq et al., 2014).

Dans le cas où les molécules à dépolymériser ne sont pas entièrement solubles, il devient alors difficile de séparer le support d'hydrolyse de l'échantillon. C'est pour cela, que des **supports solides magnétiques** ont été mis au point. Il s'agit de silice mésoporeuse sulfonée magnétique facilement séparée de l'échantillon grâce aux propriétés magnétiques apportées par les oxydes de fer (Fe_3O_4) (Vilcocq et al., 2014).

Ainsi, la nécessité de réduire la taille des polysaccharides pour augmenter leur potentiel sur différentes activités biologiques et les inclure dans des produits finaux a permis de développer différentes méthodes de dépolymérisation ayant chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Pour certaines, comme l'utilisation d'enzyme, la connaissance initiale de la structure primaire du polymère permet d'avoir plus d'information sur les fragments formés mais ne peut pas être employé sur de nouveaux polymères originaux. D'autres comme l'utilisation d'acide, sont applicables à une large de gamme de molécules mais ne s'inscrivent pas dans une chimie durable.

III. L'activités dermo-cosmétique « anti-âge »

La peau est un organe complexe, jouant un rôle de barrière entre l'environnement intérieur et le monde extérieur. Elle représente un sixième du poids total du corps et recouvre une aire d'environ 1,7 m². Par exemple, pour une personne de 70 kg, la peau représente 13 kg de la masse totale (Lai-Cheong and McGrath, 2013). Ses rôles, en plus de celui de barrière, sont de réguler l'homéostasie, prévenir la perte des fluides biologiques, maintenir la température du corps, permettre une perception sensorielle et jouer un rôle de surveillance immunitaire. Cet organe est divisé en 3 couches, de la plus externe à la plus interne se trouve l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 17) (Prost-Squarcioni, 2006).

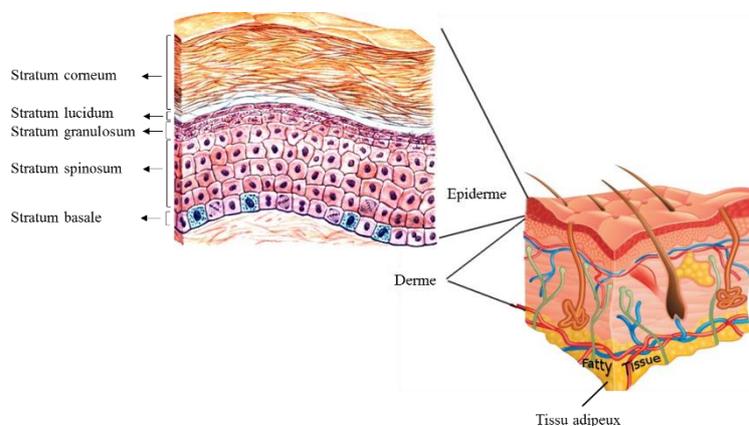


Figure 17 : Histologie de la peau (Agarwal and Krishnamurthy, 2019).

III. 1. Histologie de la peau

III. 1. a. L'épiderme

Cette couche, de poids variable, mesure entre 50 et 100 µm d'épaisseur. L'épiderme est composé de 80 % de kératinocytes, ayant un temps de renouvellement cellulaire d'environ 30 jours. Les autres cellules sont les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. Aucun vaisseau sanguin n'est présent dans cette partie de la peau. Les échanges se font uniquement par diffusion au niveau de la jonction dermo-épidermique (entre le derme et l'épiderme).

Histologiquement, cette partie de la peau est subdivisée en 4 couches (Figure 18). De la plus interne à la plus externe se trouve : la **couche basale** aussi appelée stratum basale ou germinativum, la **couche épineuse** aussi nommée stratum spinosum, la **couche granuleuse** ou stratum granulosum et la **couche cornée** aussi connue sous le nom de stratum corneum. Une cinquième couche est parfois décrite. Il s'agit de la couche claire aussi appelée stratum lucidum qui peut être considérée comme la couche inférieure de la couche cornée (Prost-Squarcioni,

2006). Au cours de ces différentes couches, les kératinocytes s'éloignent de la couche basale (la plus interne) et se différencient par un processus complexe pour former la couche cornée (la plus externe) (Brandner et al., 2015).

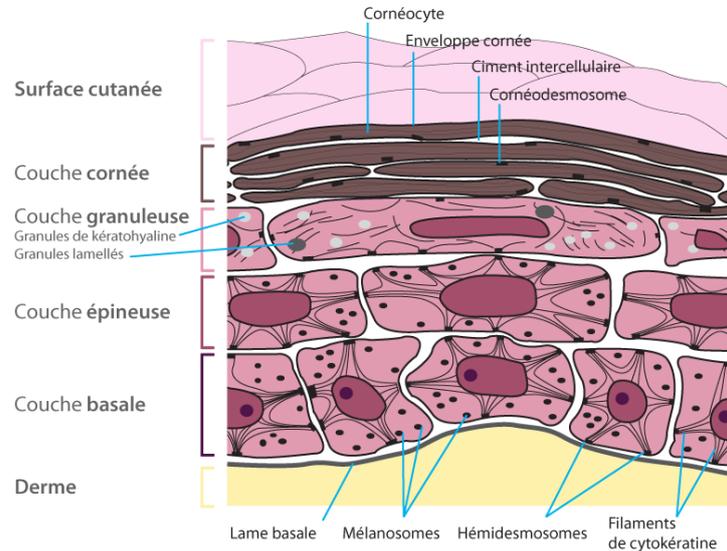


Figure 18 : Les différentes couches de l'épiderme (www.cosmeticoffincine.com).

III. 1. a. i. La couche basale (*stratum basale*)

Cette partie de l'épiderme contient majoritairement des kératinocytes indifférenciés qui se divisent via la mitose donnant deux cellules filles. Une des cellules formées reste au niveau de cette couche tandis que l'autre migre vers la surface de l'épiderme. La cellule restée dans le stratum basale est attachée à la membrane dermo-épidermique par les hémidesmosomes et génère de nouvelles cellules pour les couches plus superficielles (Tachdjian et al., 2016).

D'autres types cellulaires sont aussi présents minoritairement dans la couche basale. On retrouve des mélanocytes synthétisant la mélanine, des cellules de Langerhans ayant un rôle dans la reconnaissance de l'antigène et des cellules de Merkel responsables de la sensation tactile (Prost-Squarcioni, 2006).

III. 1. a. ii. La couche épineuse (*stratum spinosum*)

Cette couche est formée par deux à six rangées de kératinocytes. Ces cellules commencent à se différencier passant d'une forme cylindrique à une forme polynominale. La couche épineuse est caractérisée par la formation de desmosomes. Les kératinocytes produisent de la kératine qui s'agrège pour former des tonofilaments, s'assemblant eux même pour former les desmosomes. Ces derniers permettent de relier les kératinocytes entre eux en maintenant une distance de 20 nm (Agarwal and Krishnamurthy, 2019).

III. 1. a. iii. La couche granuleuse (stratum granulosum)

Cette couche est composée d'une à trois couches de kératinocytes. Morphologiquement ce sont maintenant des cellules aplaties. Cette couche est caractérisée par la formation de granules de kératohyaline. Ce sont des organelles cytoplasmiques enrichies en protéines, comme par exemple, des filaments intermédiaires de profilaggrine et de kératine. Au niveau cellulaire, les noyaux et certains organites cellulaires commencent à se dégrader via des enzymes (Dréno, 2009).

III. 1. a. iv. La couche claire (stratum lucidum)

Le stratum lucidum n'est pas présent au niveau de toutes les peaux comme le visage par exemple. Cette couche est composée de quatre à six rangées de kératinocytes. Les noyaux cellulaires sont rares et les membranes sont épaisses. Elle est souvent considérée comme une subdivision de la couche cornée (Arda et al., 2014).

III. 1. a. v. La couche cornée (stratum corneum)

Cette couche est le produit final de la différenciation des kératinocytes qui sont maintenant des cornéocytes. Elle contient entre 10 à 15 couches cellulaires, et mesure 10 µm d'épaisseur. Les cornéocytes sont des cellules aplaties, sans noyau ni organelles cellulaires. Elle a pour rôle de réguler les pertes d'eau du corps et de former une barrière contre les éléments extérieurs, comme par exemple, les microorganismes. Cette couche contient 60 % de protéines (α -kératine majoritairement), 20 % de lipides et 20 % d'eau. La composition lipidique varie en fonction des individus et de la partie de corps mais le cholestérol reste majoritaire suivi des céramides et des acides gras libres (Arda et al., 2014).

III. 1. a. vi. Les cellules majoritairement retrouvées dans l'épiderme

L'épiderme est constitué de 4 types cellulaires : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel ayant toutes des fonctions différentes au sein de cette couche. La figure 19 ci-dessous montre l'ensemble des types cellulaires dans l'épiderme.

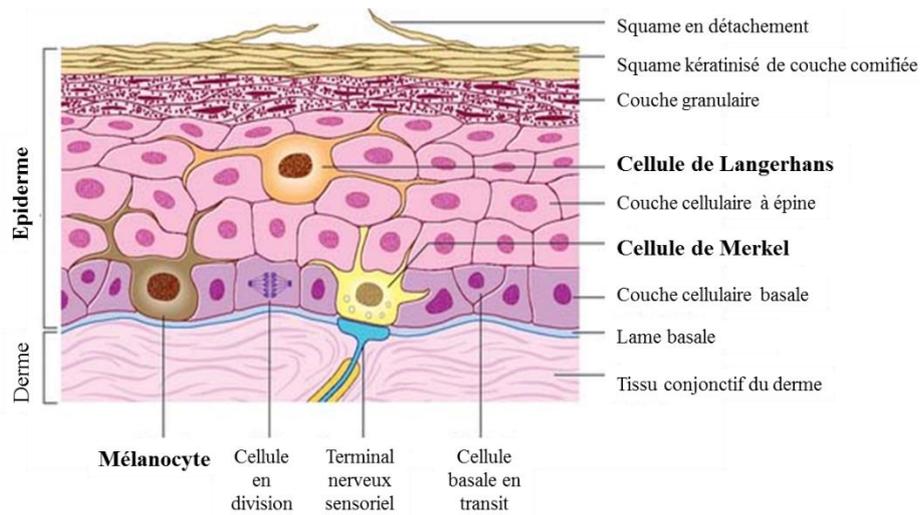


Figure 19 : Types cellulaires présents dans l'épiderme (Source : tempobioscience).

- Les kératinocytes

L'épiderme est composé de 80 % de kératinocytes donnant à ce dernier ses propriétés morphologiques. Les kératinocytes exercent trois grandes fonctions dans l'épiderme : assure la cohésion de l'épiderme, joue un rôle de barrière entre les milieux intérieurs et extérieurs et protège contre les radiations lumineuses (Prost-squarcioni et al., 2008). Plus récemment, il a été découvert que les kératinocytes exercent une activité anti-inflammatoire basale via la production de peptides antimicrobiens (Juránová et al., 2017). Ces cellules produisent les kératines qui sont des protéines fibreuses organisées en tonofilament. Elles constituent, avec les filaments d'actine et les microtubules, le cytosquelette du kératinocyte (Porter and Birgitte Lane, 2003). On retrouve environ vingt kératines regroupées en deux types : le type I correspondant aux kératines acides et le type II regroupant les kératines neutres et basiques. Ces kératines s'auto-assemblent pour former des hétérodimères composés d'une kératine de type I et une de type II. Seuls ces hétérodimères sont capables de se polymériser afin de former des filaments possédant une propriété viscoélastique leur permettant d'avoir une fonction de soutien (Wang et al., 2016). Ils sont aussi impliqués dans la migration cellulaire, l'immunité innée, la progression tumorale ainsi que dans des processus cellulaires comme la croissance et l'apoptose (Magin et al., 2007).

- Les mélanocytes

Les mélanocytes représentant 1% de la population cellulaire sont le deuxième type de cellules de l'épiderme (Dréno, 2009). Leurs rôles sont de produire via la mélanogénèse les pigments de la peau, les mélanines qui sont les eumélanines et les phéomélanines donnant respectivement des couleurs noire-marron et jaune-rouge. Ces derniers ont pour rôle de donner

la couleur constitutive de la peau, résultant d'une répartition entre ces deux pigments, (Prost-Squarcioni, 2006) et de la protéger face à la lumière solaire et aux toxines (Kumari et al., 2018). Les mélanocytes proviennent de la crête neurale et ont pour précurseurs les mélanoblastes, grandes cellules rondes ou ovulaires. Les mélanocytes sont des cellules dendritiques ayant une activité dopa-oxydasique. D'un point de vue morphologique, ce sont des cellules qui se caractérisent par un cytoplasme clair ne possédant ni tonofilament, ni desmosome mais ayant des microfilaments et des organelles spécifiques appelés mélanosomes qui sont à différents stades de maturation (Ortonne and Benedetto, 1981). Au niveau de la peau, les mélanocytes sont retrouvés de manière régulière parmi les kératinocytes basaux dans la couche basale de l'épiderme et se localisent au niveau de l'infundibulum et au sommet des papilles dermiques dans les follicules pileux. Leur nombre est variable en fonction de la localisation. Dans une peau de visage exposée, leurs nombres par mm² est de 2000 ou plus, alors que dans les autres parties du corps, ils sont entre 1000 et 1500 par mm² (Démarchez, 2019).

- Les cellules de Langerhans

Découvertes par Paul Langerhans en 1868⁷, les cellules de Langerhans sont le troisième type cellulaire représentant entre 3 et 8 % des cellules épidermiques. Ce sont des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T (Dréno, 2009). Elles sont produites au niveau des organes hématopoïétiques comme la moelle osseuse puis migrent vers l'épiderme où elles participent à la réponse immunitaire adaptative. En effet, dans les conditions physiologiques, les cellules de Langerhans maintiennent un niveau constant de tolérance immunitaire afin d'empêcher l'activation immunitaire inutile. Mais lorsque la peau est en danger comme par exemple durant une infection ou quand son intégrité physique est altérée par un traumatisme, ces cellules capturent les antigènes, assurent leur endocytose puis les réexpriment à leur surface par l'intermédiaire des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) afin d'activer les lymphocytes T (Clayton et al., 2017; Dréno, 2009).

- Les cellules de Merkel

Les cellules de Merkel sont la quatrième population cellulaire de l'épiderme et ont été découvertes par Friedrich S. Merkel en 1875. Elles proviennent des cellules souches de l'épiderme fœtal et sont localisées dans la couche basale de l'épiderme. Il s'agit de cellules neuroépithéliales exerçant une fonction tactile sensorielle. Leur distribution est hétérogène avec

⁷ Source : Portait de Médecins, Paul Langerhans.
<http://www.medarus.org/Medecins/MedecinsTextes/langerhans.htm> (consulté le 20 août 2019)

une forte présence au niveau des lèvres, des paumes, des pulpes des doigts, dans le dos et les pieds (Moll et al., 2005).

III. 1. b. Le derme

Cette couche se situe entre l'épiderme et l'hypoderme. Elle mesure entre 0,5 et 5 mm d'épaisseur suivant les zones du corps. Par exemple, le derme mesure 0,5 mm d'épaisseur au niveau des paupières et 5 mm au niveau du dos. Il est classiquement divisé en deux couches : le derme papillaire et le derme réticulaire. Le derme papillaire, le plus superficiel, qui se trouve sous l'épiderme, est un tissu conjonctif lâche alors que le derme réticulaire est un tissu conjonctif plus dense. Le derme est une couche résistante permettant de protéger les autres organes du corps contre les chocs physiques par exemple. Cette partie de la peau est aussi composée de molécules matricielles et de composants cellulaires. Les composants matriciels sont des fibres de collagènes et d'élastines, des protéoglycanes et des glycoprotéines. Le collagène représente 70 % du derme dont 75 % correspondent à du collagène de type I et 15 % à du collagène de type III. Les fibroblastes sont les cellules majoritaires du derme et sécrètent les molécules matricielles. D'autres types cellulaires sont aussi présents dans cette partie de la peau comme des cellules immunitaires avec les mastocytes et les cellules dendritiques ainsi que des vaisseaux sanguins et lymphatiques et des nerfs sensoriels (Prost-squarcioni et al., 2008).

III. 1. b. i. Les cellules constituant le derme

- **Les cellules dendritiques dermiques**

Les cellules dendritiques dermiques ne forment pas un ensemble homogène. Ce groupe comprend des cellules résidentes et des cellules en transit. Leur origine est encore incertaine mais elles pourraient provenir des cellules de Langerhans migrant vers l'épiderme ou au contraire, être des cellules venant de la couche basale de l'épiderme qui se dirigent vers les ganglions lymphatiques drainants (Bouloc, 2001). Elles interviennent dans l'immunité de la peau en présentant des antigènes aux autres cellules immunitaires.

- **Les mastocytes**

Les mastocytes, d'origine hématopoïétique, sont principalement localisés près des vaisseaux sanguins, des corpuscules nerveux et des annexes épidermiques comme les follicules pilo-sébacés et les glandes sudorales. Ce sont des cellules mononuclées avec de nombreuses expansions cytoplasmiques et dont le cytoplasme est rempli de granulation. C'est la présence des granules et leurs compositions qui font des mastocytes des unités exocrines à part entière.

Ils interviennent dans les différentes phases de l'inflammation, la réparation des plaies et le remodelage des tissus (Prost-squarcioni et al., 2008).

- Les macrophages

Les macrophages sont aussi d'origine hématopoïétique. Les monocytes se différencient dans le sang puis deviennent des macrophages dans le derme où ils perdent leur capacité à proliférer. Ils ont une fonction de défense en phagocytant les pathogènes et en présentant les antigènes aux lymphocytes et autres cellules immunitaires. Ils sont capables de sécréter une large gamme de facteurs impliqués dans la régulation des réponses immunitaires et dans l'inflammation (Prost-squarcioni et al., 2008).

- Les fibroblastes/fibrocytes

Les fibroblastes dérivent des cellules souches mésenchymateuses (tissus de soutien de l'embryon) (Lai-Cheong and McGrath, 2013). Ce sont les cellules majoritaires du derme, plus nombreuses et métaboliquement plus actives dans le derme papillaire que dans le derme réticulaire. Comme les cellules dendritiques, les fibroblastes forment un groupe de cellules hétérogènes. Les fibroblastes ont pour rôles principaux de synthétiser et de dégrader la matrice extracellulaire (MEC) du derme. En effet, les fibroblastes produisent les macromolécules de la MEC qui sont le collagène, l'élastine, la fibrilline, des facteurs de croissance, des enzymes et la substance fondamentale amorphe. Cette dernière est composée de glycoaminoglycanes, comme l'acide hyaluronique, de protéoglycanes et de fibronectine. La substance fondamentale amorphe a pour rôle de maintenir des interactions entre les cellules du derme et la MEC, de permettre le mouvement cellulaire et de contrôler l'hydratation et l'équilibre ionique du derme. Les fibroblastes sont aussi des cellules mécano-sensibles, c'est-à-dire que ce sont des cellules sentinelles modulant les phénomènes immunitaires à l'échelle locale du derme. Ils interviennent aussi dans la cicatrisation en se transformant en myofibroblastes, permettant, par exemple, de réparer un tissu après une coupure.

III. 1. c. L'hypoderme

L'hypoderme, aussi appelé tissu sous-cutané, constitue une interface entre le derme et les structures mobiles comme les tendons et les muscles. Cette couche est formée d'un tissu conjonctif lâche contenant des adipocytes et des fibres de collagène. Ce tissu est composé de deux parties : le pannicule adipeux qui est la couche superficielle formée de lobules d'adipocytes, et une couche fibreuse qui est la partie profonde reliée au derme par les ligaments

cutanés (Tachdjian et al., 2016). Le tissu adipeux représente entre 10 et 20 % du poids total chez un homme adulte et entre 15 à 30 % chez une femme (Peterson et al., 2003).

L'hypoderme assure différentes fonctions dans l'organisme (Franchi et al., 2003) :

- Il assure une protection physique et mécanique ;
- Il permet un isolement thermique en diminuant la déperdition de chaleur ;
- Il stocke les réserves énergétiques ;
- Il sécrète un grand nombre de substances ayant des actions endocrines ou paracrines.

Ce tissu sous-cutané est formé de différents types cellulaires (Figure 20) :

- Les adipocytes blancs matures ;
- Les cellules de la fraction stroma-vasculaire composées de pré-adipocytes, de cellules souches mésenchymateuses, de cellules endothéliales et de macrophages.

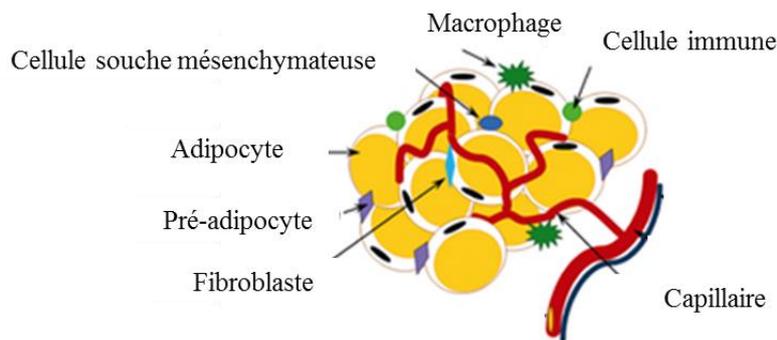


Figure 20 : Types cellulaires présents dans l'hypoderme (Wronska and Kmiec, 2012).

III. 1. d. La vascularisation de la peau

La vascularisation de la peau est présente dans le derme et l'hypoderme. L'épiderme est la seule couche qui ne présente pas de vascularisation et se nourrit grâce à des échanges avec le derme sous-jacent (Tachdjian et al., 2016). La vascularisation commence dans la couche profonde de l'hypoderme où des artères et des veines forment un 1^{er} réseau anastomotique parallèle à la surface cutanée (Figure 21). De ce réseau partent des branches perpendiculaires à ce dernier, traversent l'hypoderme afin de vasculariser les lobes graisseux et les annexes comme les glandes sudoripares puis se rassemblent afin de former le 2^{ème} réseau anastomotique au niveau de la partie profonde du derme réticulaire, parallèle au 1^{er}. Ensuite, des artérioles perpendiculaires partent de ce 2^{ème} réseau afin de former des branches pour vasculariser les annexes cutanées et le derme réticulaire. Pour terminer, ces branches s'assemblent pour former

le 3^{ème} et dernier réseau anastomotique situé à la jonction de derme papillaire et du derme réticulaire (Prost-squarcioni et al., 2008).

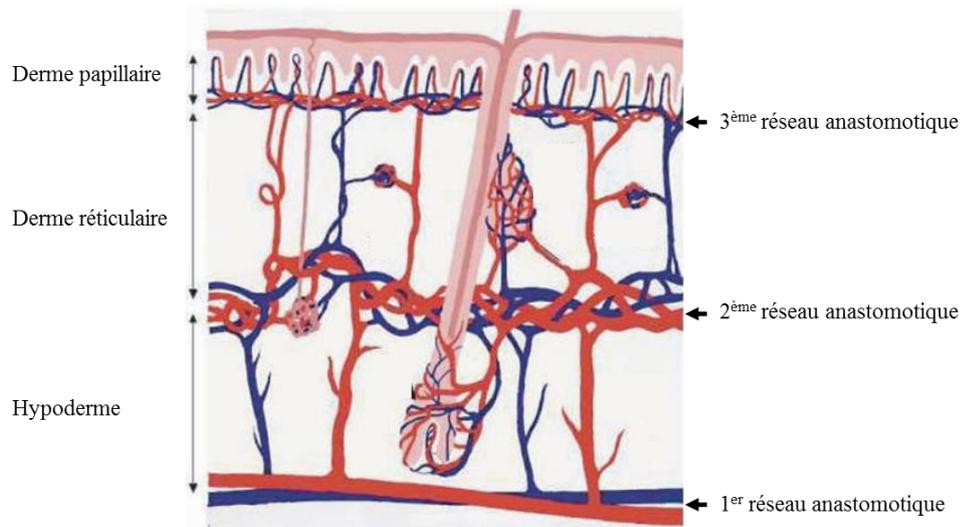


Figure 21 : Vascularisation de la peau (Prost-squarcioni et al., 2008).

III. 2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est un réseau complexe, structuré, composé de diverses macromolécules de nature protéique et glucidique. Ses rôles sont de lier des cellules homologues et hétérologues entre elles, de fournir un squelette structuré afin de protéger les tissus, de réguler la disponibilité des facteurs de croissance et de moduler les phénotypes des cellules qui la synthétise. La formation de la matrice est maximale durant le développement puis devient plus lente voire disparaît avec l'âge. La matrice extracellulaire est composée de trois types de macromolécules : des polysaccharides complexes (GAG ou protéoglycanes), des protéines et glycoprotéines fibreuses volumineuses comme le collagène et l'élastine et des glycoprotéines plus petites comme la fibronectine et la laminine (Figure 22) (Schultz et al., 2005).

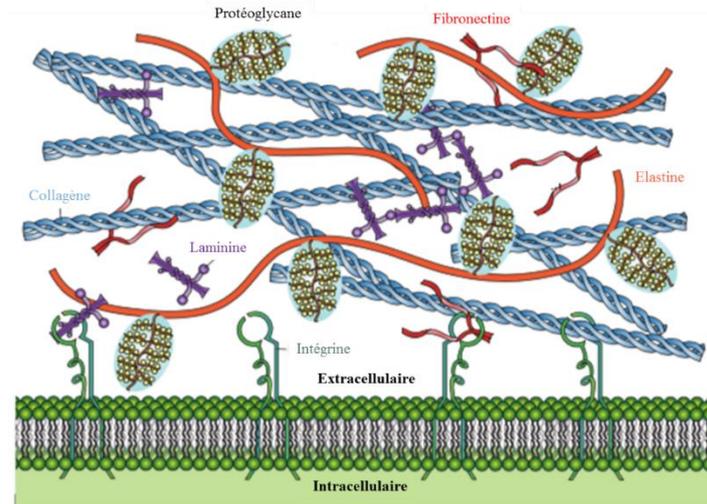


Figure 22 : Composants principaux de la matrice extracellulaire du derme (Source : Biology LibreTexts).

III. 2. a. Les glycosaminoglycanes (GAGs) et les protéoglycanes

Les glycosaminoglycanes sont de longues chaînes polysaccharidiques non ramifiées composés d'unité dissaccharidique répétée. Ces unités sont composées d'un sucre aminé comme le galactosamine ou le glucosamine et d'un acide uronique comme l'acide glucuronique ou l'acide iduronique. Les liaisons principalement retrouvées sont de type β -1,3 ou β -1,4. Dans la peau, les GAGs principalement retrouvés sont : le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, l'héparane sulfate et le kératane-sulfate, l'héparine et l'acide hyaluronique. A l'exception de l'acide hyaluronique, tous les GAGs contiennent des groupements sulfates et sont présents dans des complexes avec des protéines, portant dans ce cas le nom de protéoglycanes. Les principaux protéoglycanes retrouvés dans la peau sont le versicane, la décorine et le perlécane (Lee et al., 2016). Au niveau de la peau, ces GAGs ont un rôle important dans l'hydratation de cette dernière. En effet, ce sont des molécules très hydrophiles qui prennent une configuration allongée au niveau de la matrice extracellulaire occupant ainsi un volume important par rapport à leur poids. De par la présence de charge négative due à la présence des acides uroniques et/ou des groupements sulfates, le GAGs captent des cations comme le Na^+ , qui tient un rôle important dans l'équilibre osmotique de la peau. Ceci a pour conséquence la formation d'un grand nombre de liaisons avec l'eau permettant de maintenir l'hydratation cutanée (Kroma et al., 2012).

- **L'acide hyaluronique**

L'acide hyaluronique (AH), dont la structure est représentée par la figure 23 , a pour ose uronique l'acide D-glucuronique et le N-acétyl-D-glucosamine pour ose aminé. Les deux monomères sont reliés par une liaison β ,1-3 et les unités disaccharidiques sont unies par des

liaisons β ,1-4. La masse moléculaire de l'acide hyaluronique est comprise entre 10^5 et 10^7 Da. (Gall, 2010).

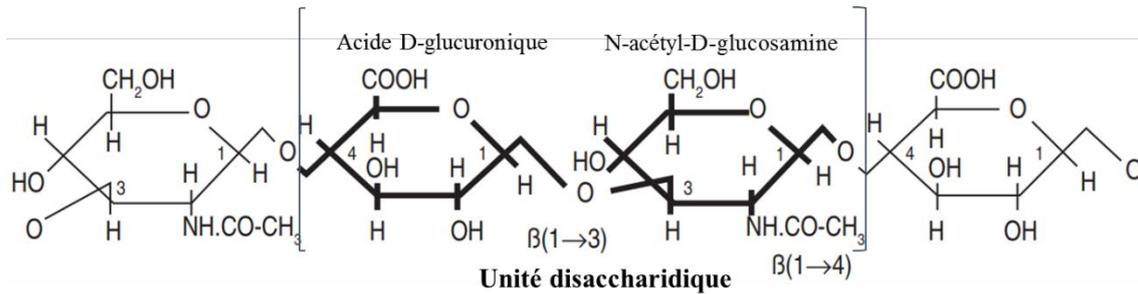


Figure 23 : Structure biochimique de l'acide hyaluronique (Gall, 2010).

Il fût isolé pour la première fois par Meyer et Palmer en 1934 dans l'humeur vitré de l'œil de bœuf (Meyer and Palmer, 1934). La quantité d'acide hyaluronique dans le corps est estimée à 15 g, dont la moitié est retrouvée dans la peau (Manuskiatti and Maibach, 1996). L'acide hyaluronique est synthétisé par les cellules mésenchymateuses, épithéliales et immunitaires ainsi que par les cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques. Au niveau de la peau, l'acide hyaluronique est retrouvé dans les couches épineuses, granuleuses et basales de l'épiderme et dans les deux couches du derme (papillaire et réticulaire). Dans l'épiderme, l'acide hyaluronique est synthétisé par les kératinocytes et dans le derme, ce sont les fibroblastes qui assurent sa production (Weigel et al., 1997). Dans la matrice extracellulaire, l'acide hyaluronique interagit avec les autres protéoglycanes sulfatés, comme le versicane, où il joue le rôle de matrice et capte une large quantité d'eau et d'ions afin de maintenir l'hydratation et la turgescence des tissus (Papakonstantinou et al., 2012).

L'acide hyaluronique n'est pas synthétisé comme les autres glycosaminoglycanes. En effet, alors que les autres glycosaminoglycanes sont synthétisés au niveau de l'appareil de Golgi, l'acide hyaluronique est fabriqué au niveau de la face interne de la membrane cellulaire. Lors de sa synthèse, l'acide hyaluronique passe au travers de la membrane pour terminer sa croissance dans la matrice extracellulaire (Gall, 2010). La production d'acide hyaluronique est réalisée par des glycosyltransférases appelées hyaluronates synthétases (HAS). Ce sont des enzymes situées au niveau de la membrane plasmique utilisant uniquement des ions magnésiums (Mg^{2+}) et les unités disaccharidiques pour le fabriquer (Markovitz et al., 1959). Chez les mammifères il existe 3 hyaluronates synthétases, *Has1*, *Has2* et *Has3*, qui se différencient par la tailles des polymères d'acide hyaluronique formés. *Has1* et *Has2* produisent des molécules de haut poids moléculaire, dont la masse est comprise entre 2×10^6 et 4×10^6

Da, alors que l'acide hyaluronique produit par *Has3* a un poids compris entre $0,4 \times 10^5$ et $2,5 \times 10^5$ Da (Lee et al., 2016).

Concernant la dégradation de l'acide hyaluronique, son turnover est rapide car son temps demi-vie est compris entre 2 et 5 minutes (Gall, 2010). Sa dégradation est principalement enzymatique par l'intermédiaire de 6 hyaluronidases (HYAL) clivant chacune de façon spécifique la molécule d'acide hyaluronique. La dégradation est initiée par les HYAL-1 et HYAL-2 qui génèrent des fragments importants qui sont ensuite dégradés en oligosaccharides par les autres hyaluronidases. Cette dégradation se déroule dans des mini-organelles liées au récepteur CD44 (Gall, 2010). Il est à noter que la dégradation de l'AH peut se faire de manière non enzymatique, par l'intermédiaire des ROS comme H_2O_2 , HO^- ou bien O_2^- , principalement au niveau des sites inflammatoires ou dans des lésions tissulaires (Girish and Kemparaju, 2007).

- *Le versicane*

Le versicane est un protéoglycane composé d'un cœur protéique de 265 kDa formé de deux domaines globulaires, et de 15 à 20 chaînes de chondroïtine sulfate et de dextrane sulfate. Il est principalement localisé au niveau des fibroblastes dermiques humains et des vaisseaux sanguins. Il intervient dans la résistance des vaisseaux sanguins face aux forces de compressives pulsatiles (Praillet et al., 1998). Son domaine N-terminal reconnaît et se lie spécifiquement à l'acide hyaluronique avec une affinité relativement importante (Sorrell et al., 1999).

- *La décorine*

La décorine fait partie des petits protéoglycanes composés d'un cœur protéique riche en leucine de 40 kDa et d'une chaîne latérale de chondroïtine sulfate ou dermatane sulfate. Le cœur protéique est formé de 3 domaines : une extrémité N-terminal où le glycosaminoglycane est fixé, un domaine central riche en leucine et une extrémité C-terminal composée principalement de résidus de cystéine (Praillet et al., 1998). Ce protéoglycane, synthétisé par les fibroblastes dermiques, représente entre 30 et 40 % des protéoglycanes présents dans la MEC avec une distribution sur l'ensemble du corps. Sa fonction principale est de se fixer aux fibres de collagène de type I et de moduler la fibrillogenèse du collagène (Danielson et al., 1997). Elle est aussi capable de se lier à d'autres molécules présentes dans la matrice extracellulaire comme le facteur de croissance transformant beta ($TGF-\beta$) (Nomura, 2006). La décorine est aussi impliquée dans la croissance tumorale et l'angiogenèse par exemple. En effet, dans le cas du cancer, il a été démontré qu'elle inhibait la croissance et l'angiogenèse tumorale (Nomura, 2006). Dans les cellules saines, la décorine permet d'améliorer la survie cellulaire

mais les mécanismes d'actions restent à élucider, et de moduler la réponse cellulaire aux facteurs de croissance (Reed and Iozzo, 2002).

- *Le perlécane*

Le perlécane est composé d'un cœur protéique de 400 à 500 kDa comprenant cinq domaines distincts et de trois chaînes d'héparane sulfate (Noonan et al., 1991). Le perlécane est localisé dans les membranes basales. La partie protéique interagit avec de nombreuses molécules comme des facteurs de croissance, des molécules de la matrice extracellulaire comme le collagène de type IV et les lamines, et des molécules de signalisation comme la fibronectine. Ce protéoglycane intervient dans la croissance, la différenciation, l'adhésion et la mobilité cellulaire lors du remodelage tissulaire et l'homéostasie (Ida-Yonemochi, 2013).

III. 2. b. L'élastine

L'élastine (figure 24) est une protéine fibreuse extracellulaire responsable de l'élasticité des tissus. C'est une protéine insoluble, amorphe, hydrophobe et extensible. Elle est retrouvée majoritairement dans les tissus qui ont besoin d'une résistance mécanique comme la peau, les poumons, les ligaments et certaines artères comme l'aorte (Kielty et al., 2002). Au niveau de la peau, l'élastine est synthétisée majoritairement par les fibroblastes mais les kératinocytes sont aussi capables de la produire. Elle ne représente que 2 % des protéines totales du derme mais est essentielle pour l'homéostasie de ce dernier. D'un point de vue structural, c'est une protéine riche en acide aminé comme la glycine, la proline, l'alanine, la leucine, et la valine. Elle est composée d'une répétition de petites séquences de 3 à 9 acides aminés lui donnant sa flexibilité et sa structure dynamique (Weihermann et al., 2016).

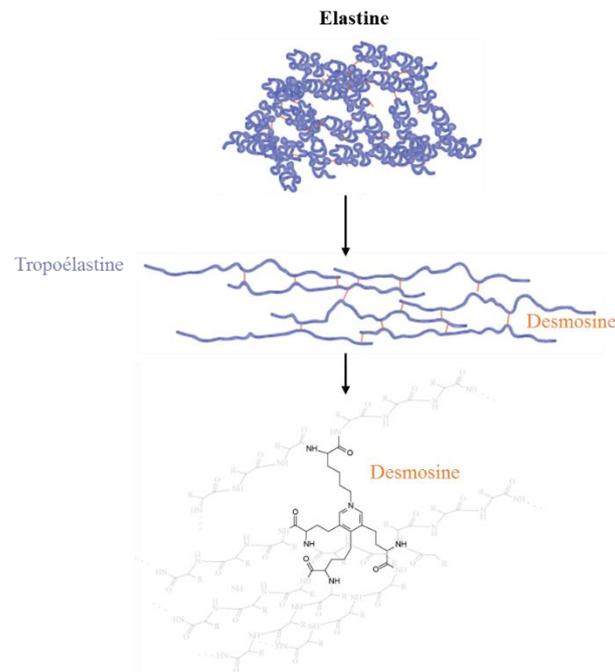


Figure 24 : Structure de l'élastine.

Sa synthèse, aussi nommée élastogénèse, se déroule dans le réticulum endoplasmique rugueux des fibroblastes dermiques. La forme produite portant le nom de tropoélastine, subit ensuite des modifications post-traductionnelles intracellulaires. Dans cette phase, des protéines de liaisons à l'élastine (EBP) s'associent à la tropoélastine formant un complexe qui sera libéré à la surface de la cellule. Cette modification post-traductionnelle intracellulaire permet de stabiliser l'élastine (Weihermann et al., 2016). D'un point de vue structural, la tropoélastine est un polypeptide dont la taille est comprise entre 70 et 72 kDa et très hydrophobe car elle contient 95 % d'acides aminés apolaires comme la glycine, l'alanine et la valine par exemple. Elle est constituée d'une alternance de séquences hydrophobes et de séquences riches en alanine et en lysine. La fibre d'élastine est formée dans un premier temps par l'assemblage des tropoélastines via des liaisons hydrophobes avant que les résidus de lysine soient modifiés par une lysesyloxydase. En effet, dans un second temps, une liaison spontanée entre 4 résidus lysine, modifiés ou non, entre les tropoélastines permet la formation des acides aminés de pontages qui sont les desmosines et isodesmosines propre à la fibre d'élastine (de Jaeger and Cherin, 2012).

La production d'élastine débute au milieu de la gestation et est maximale pendant la période néonatale. Elle s'arrête à la puberté et diminue au cours de la vie mais cette production peut être réactivée au moment de la cicatrisation. L'élastine fait partie des protéines les plus résistantes de notre organisme avec un temps de demi-vie estimé à 70 ans (Weihermann et al., 2016). L'élastine est dégradée, dans la MEC par différentes métalloprotéases comme les

gélatinases A (MMP-2) et B (MMP-9), la matrylsine (MMP-7) et l'élastase des macrophages (MMP-12) (Van Doren, 2015).

III. 2. c. Le collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante du corps humain, représentant 30 % des protéines totales de l'homme. Le derme contient entre 65 à 75 % de collagène (en poids sec). Son rôle principal est de donner aux tissus une résistance face aux forces de tensions. Il intervient aussi dans l'adhésion, la différenciation, la migration et la prolifération cellulaire ainsi que dans l'apoptose (de Jaeger and Cherin, 2012). Les différents niveaux de sa structure sont représentés dans la figure 25 ci-dessous.

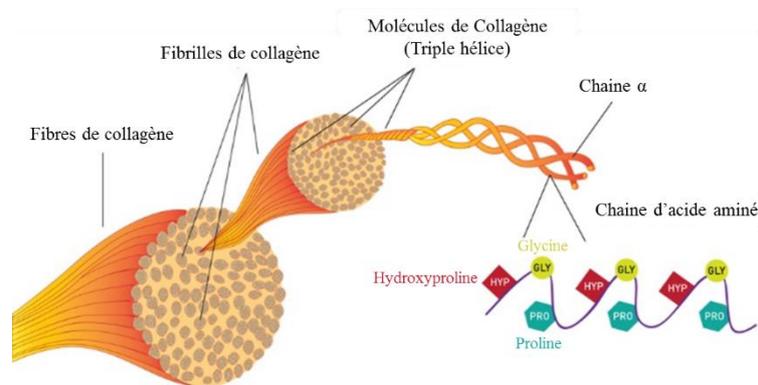


Figure 25 : Structures des fibres de collagènes (Sibilla et al., 2015).

A ce jour, 27 collagènes ont été décrits. Ils sont numérotés en chiffres romains de I à XXVII, dans l'ordre de leur découverte. Initialement, ces collagènes étaient classés en 2 groupes : les collagènes fibrillaires et les non-fibrillaires. Cette classification se fait en fonction de la capacité du collagène à former ou non des agrégats visibles au microscope électronique. Mais les découvertes actuelles ont mis un nombre important de collagène non-fibrillaire en évidence nécessitant la création de sous famille rassemblant les collagènes qui présentent des identités de structures, ou ceux formant des assemblages supra-moléculaires spécifiques (Ruggiero et al., 2005).

D'un point de vue structural, 3 critères importants définissent un collagène. Tout d'abord, les collagènes sont retrouvés dans l'espace extracellulaire, puis la structure doit contenir au moins une triple hélice formée par 3 chaînes α s'enroulant pour former une hélice droite, et enfin cette molécule doit avoir la capacité de former des agrégats supra-moléculaires. Il est à noter que le domaine hélicoïdal contient une répétition de résidus Glycine-X-Y où les acides aminés X et Y sont très souvent respectivement de la proline et de l'hydroxyproline (Hulmes, 2008).

Au niveau de la peau, le collagène est principalement retrouvé dans le derme où il est le composant principal de ce dernier (Agarwal and Krishnamurthy, 2019). Il contient majoritairement les collagènes fibrillaires I à 75 % et III à 15 % mais sont aussi retrouvés les collagènes FACITs (Fibril associated collagen with interrupted triple helix), les collagènes de types XII, XIV, XVI et VI (Ruggiero et al., 2005). D'autres collagènes dans la jonction dermo-épidermique comme le collagène de type VII forment des filaments d'ancrage pour l'épiderme sur le derme. (Katsurou et al., 1989).

Au niveau de la synthèse de ces collagènes, les connaissances actuelles s'appuient principalement sur les collagènes fibrillaires. De façon générale, la biosynthèse du collagène se déroule dans les compartiments intracellulaires pour former le pro-collagène. Tout d'abord, les chaînes α de pro-collagène sont synthétisées au niveau des ribosomes. Elles subissent ensuite des modifications post-traductionnelles au niveau du réticulum endoplasmique rugueux. A ce stade, le pro-collagène est sous forme d'une triple hélice α dont les extrémités possèdent des N-glycosylations stabilisées par des ponts disulfures. Une fois dans l'appareil de Golgi, les triples hélices de pro-collagène sont sécrétées, par l'intermédiaire de vésicules, dans la matrice extracellulaire et subissent de nouvelles modifications post-traductionnelles comme le clivage des extrémités N et C terminales. La perte de ces glycosylations permet l'auto-assemblage des triples hélices en structure supramoléculaire fibrillaire formant aussi les molécules de collagène (Koide and Nagata, 2005).

III. 2. d. Dégradation des protéines de la matrice extracellulaire

La dégradation des protéines de la matrice extracellulaire est assurée par les métalloprotéases (MMP). Ce sont des endopeptidases dépendantes des ions zinc (Zn^{2+}). Elles sont sécrétées dans la matrice extracellulaire, au niveau de l'épiderme par les kératinocytes et au niveau du derme par les fibroblastes. Elles dégradent de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire et de la lame basale. Elles jouent un rôle important dans les phénomènes physiologiques et pathologiques comme le développement de l'embryon, l'angiogenèse, l'immunité, l'inflammation, l'invasion tumorale et métastatique (de Jaeger and Cherin, 2012).

D'un point de vue structural, les MMP possèdent quatre domaines : le pré-domaine, le pro-peptide, le domaine catalytique et le domaine de l'hémopexine à l'extrémité C-terminal. Il est à noter que le pré-domaine est absent chez les MMP transmembranaires (Jabłońska-Trypuc et al., 2016).

Actuellement, 23 MMP ont été identifiés et sont classés en différentes familles, en fonction de leurs substrats et de leurs structures :

- Les collagénases : MMP-1, MMP-8 et MMP-13.
- Les gélatinases : MMP-2 et MMP-9.
- Les stromélysines : MMP-3, MMP-7, MMP-10 à MMP-12, MMP-23 et MMP-26.
- Les MMP membranaires : MMP-14 à MMP-17, MMP-24 et MMP-25.
- Les nouvelles MMP : MMP-19, MMP-27 et MMP-28.

Toutes les MMP sont synthétisées sous forme de pro-MMP inactives et sont activées par des modifications post-traductionnelles qui peuvent se faire soit dans la cellule sous l'influence par exemple de la furine (protéase à sérine), soit dans la matrice extracellulaire sous l'influence de la plasmine (peptidase) (de Jaeger and Cherin, 2012).

Dans la peau, les MMP principalement retrouvées et qui dégradent les fibres de collagène et d'élastine sont les MMP-1, MMP-2, MMP-3 et MMP-9 (Van Doren, 2015). La MMP-1 appartient à la famille des collagénases. Cette enzyme est sécrétée par les leucocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Dans la peau, c'est la seule MMP à pouvoir cliver les fibres de collagène en fragments faisant $\frac{3}{4}$ et $\frac{1}{4}$ de la forme initiale. Ces fragments formés sont ensuite dénaturés par les autres MMP présentes dans la matrice extracellulaire (Iyer et al., 2006; Van Doren, 2015).

Les MMP-2 et MMP-9 sont des gélatinases respectivement de 92 kDa et 72 kDa. Elles sont sécrétées par les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes et sont capables de dégrader les fibres de collagène initialement dénaturées par la MMP-1. Elles ont aussi la capacité de cliver les fibres d'élastine. La MMP-9 a une forte spécificité pour les fibres d'élastine alors que la MMP-2 est plus spécifique pour les fibres de collagène de type III et dégrade les composants de la jonction dermo-épidermique. La MMP-3 appartient à la famille des stromélysines. Elle est sécrétée par les fibroblastes et les macrophages. Elle intervient au même stade que les MMP-2 et MMP-9 dans le clivage des fibres de collagène dénaturées (Pittayapruek et al., 2016). Ces 3 MMP sont fortement régulées par le facteur transcriptionnel AP-1 qui est rapidement induit et activé après une exposition aux UV (Quan et al., 2009).

Au niveau de leur inhibition, la plupart des MMP sont inhibées par les inhibiteurs tissulaires (TIMPs). Il s'agit d'une famille de quatre inhibiteurs de protéases nommés TIMPs-1 à TIMPs-4 (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010).

Ainsi, la peau est un organe complexe avec une composition très variée et en permanence renouvelée. Les composants essentiels de cet organe permettent d'assurer ces fonctions comme la protection du milieu intérieur face au monde extérieur. De plus, la peau traduit le plus souvent les signes de l'âge avec l'apparition de rides et/ ou une perte d'élasticité par exemple. Dans notre société, où l'apparence parfaite est en constante recherche, le vieillissement cutané est donc devenu la cible de nombreux actifs anti-âge.

III. 3. Le vieillissement cutané

Le vieillissement cutané est un phénomène normal, très variable d'un individu à un autre du même âge. Il est sous l'influence de deux processus biologiques distincts : les facteurs intrinsèques génétiquement programmés et les facteurs extrinsèques majoritairement dus à l'exposition aux Ultra-Violet (figure 26).

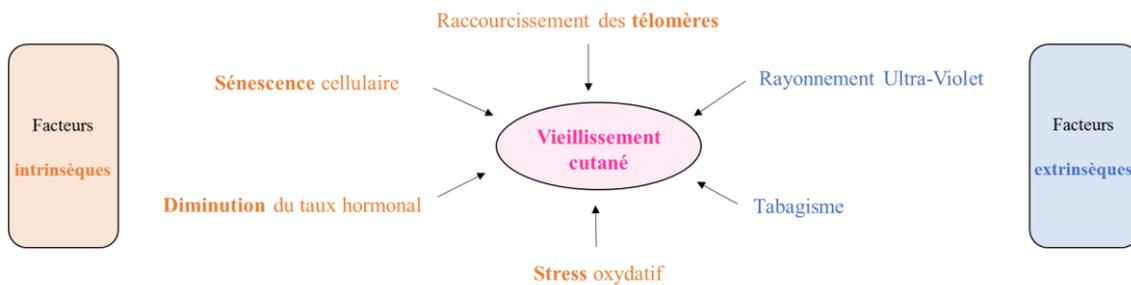


Figure 26 : Facteurs influençant le vieillissement cutané.

III. 3. a. Les facteurs intrinsèques

La peau est soumise, comme l'ensemble des organes de notre corps, au phénomène de vieillissement intrinsèque qui est un processus lent. D'un point de vue histologique, la couche cornée reste inchangée alors que le derme, la jonction dermo-épidermique ainsi que l'épiderme sont amincis (Beylot, 2009). Le nombre de fibroblastes est diminué ainsi que leur capacité à produire des macromolécules constituant la matrice extracellulaire. Avec l'âge, les fibres de collagène et d'élastine diminuées, deviennent plus denses et perdent leur organisation structurée (Figure 27). Il existe différentes causes pour expliquer ce vieillissement dont quatre majoritaires qui sont le raccourcissement des télomères, la diminution des hormones notamment due à la ménopause, la sénescence cellulaire et le stress oxydatif (Beylot, 2009).

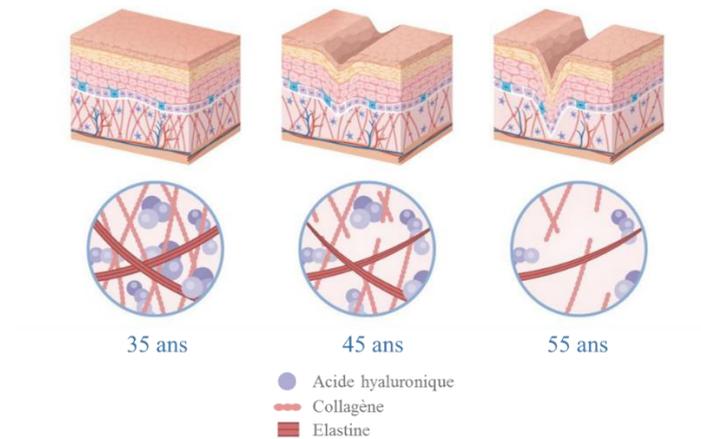


Figure 27 : Modifications de la peau liées au vieillissement cutané (Source : istockphoto)

- *Le raccourcissement des télomères*

Les télomères sont des séquences d'ADN répétées (5'-(TTAGGG) -3') situées à l'extrémité des chromosomes ayant pour rôle de les protéger. A chaque mitose, dans les cellules somatiques normales, les télomères se raccourcissent d'environ 2 kilobases dus à la non-activité de la télomérase (Harley et al., 1990). Il a été démontré que les télomères des cellules de l'épiderme sont plus courts que ceux des cellules du derme. En revanche, il n'y a aucune différence de longueur entre les hommes et les femmes (Allsopp et al., 1992). Quand ces derniers atteignent une taille insuffisante, la cellule cesse de proliférer, et une variété de fonction cellulaire est altérée. C'est ce qu'on appelle la sénescence cellulaire.

- *Sénescence cellulaire*

La sénescence cellulaire fût initialement décrite par L. Hayflick qui découvrit que les cellules somatiques cessent de proliférer après un nombre précis de mitose. Lorsque ce nombre est atteint, des signaux bloquant la prolifération sont déclenchés. La sénescence est caractérisée par un arrêt irréversible du cycle cellulaire au niveau de la phase G1, associé à des changements morphologiques et physiologiques (Hayflick, 1965; Hayflick and Moorhead, 1961).

Ce processus résulte d'une diminution de la capacité des cellules de la peau à proliférer, une baisse de la synthèse des composants de la matrice extracellulaire et une augmentation de l'expression d'enzyme dégradant les collagènes présents dans la matrice extracellulaire (Jenkins, 2002).

Le vieillissement, associé à la réduction de la croissance cellulaire, peut être expliqué par une régression sélective de nombreux gènes régulant la croissance cellulaire. Leur expression est maximale lorsque la cellule progresse dans la phase G1 du cycle cellulaire et lors de la synthèse d'ADN. Par exemple, chez les fibroblastes dermiques humains sénescents, les

gènes de régulation sont le proto oncogène c-fos, les gènes codant pour les protéines hélice-tour-hélice Id-1 et Id-2 ainsi que le facteur de transcription E2F. Des régulateurs négatifs comme les inhibiteurs p21 et p16 des protéines kinases sont surexprimés chez les cellules sénescents (Jenkins, 2002).

- Diminution des hormones

La ménopause se caractérise par la cessation de la menstruation et par l'arrêt des sécrétions ovariennes œstro-progestatives associé à la persistance d'une sécrétion d'androgènes. Les principaux androgènes produits par les femmes sont le Δ 4-androstènedione d'origine ovarienne et la dihydroépiandrostérone. La testostérone ne représente que 5 % d'androgènes chez la femme. A la ménopause, la diminution des hormones stéroïdiennes augmente l'impact des androgènes, et plus particulièrement le Δ 4-androstènedione, sur la couche sébacée. Une diminution d'œstrogènes induit un ralentissement de l'activité mitotique de la couche basale de l'épiderme, réduit la synthèse de collagène et aplatit la jonction dermo-épidermique (Bensaleh et al., 2008).

- Stress oxydatif

Dans les années 50, la théorie du stress oxydatif du vieillissement fut émise par D. Harman. Cette hypothèse suggère que le stress oxydatif est le principal facteur responsable des processus de dégradation et dysfonctionnement cellulaire. Les radicaux libres de l'oxygène sont générés en faible quantité (5 à 10 %) mais de façon continue durant le métabolisme oxydatif normal. Les espèces réactives de l'oxygène (H_2O_2 , $HO\cdot$) causent des dommages au niveau des lipides, des protéines et de l'ADN simple ou double brin. Il a été démontré qu'une faible exposition au peroxyde d'hydrogène provoquait l'entrée de la cellule dans la sénescence cellulaire précédemment décrite (Gladyshev, 2014; Harman, 1956).

Les protéines, de par leur groupement sulfure ou leur caractère insaturé, sont particulièrement sensibles aux agressions des radicaux libres. Au niveau cutané, les conséquences sont multiples comme la dépolymérisation des fibres de collagène et d'élastine ainsi que la formation d'agrégats protéiques. L'attaque des radicaux libres sur les lipides a pour conséquence la perte de l'intégrité des membranes cellulaires. En effet, les lipides, majoritairement présents au niveau des membranes, sont des cibles idéales pour les radicaux libres de par leur caractère polyinsaturé. A long terme, l'oxydation des acides gras membranaires est responsable de la formation et l'accumulation de pigments lipofusciniques (pigment formé par la liaison de lipide à des protéines). Au niveau de l'ADN, les radicaux libres

altèrent le processus normal de réplication. Ceci génère des mutations pouvant provoquer la mort cellulaire ou un cancer. Les agressions des radicaux libres sur l'ADN mitochondrial, plus sensible, entraînent une diminution de l'énergie interne mitochondriale (Boisnic and Branchet, 2005).

III. 3. b. Les facteurs extrinsèques

Les rayonnements UV sont les principaux facteurs responsables du vieillissement extrinsèque par leur pénétration dans la peau. Les UVB, fortement énergétiques, lèsent l'épiderme alors que les UVA, moins énergétiques, endommagent le derme superficiel (Figure 28). Les infrarouges, faiblement énergétiques, atteignent l'hypoderme (Beylot, 2009).

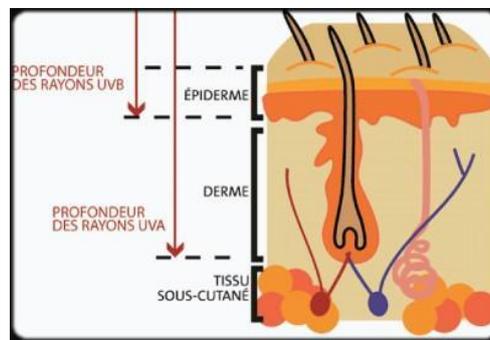


Figure 28 : Pénétration des UV dans la peau (Source : Oldenskin).

Leur action est double. Tout d'abord, les UV peuvent agir directement sur l'ADN cellulaire, c'est le cas par exemple des UVB ou indirectement par l'intermédiaire des formes réactives de l'oxygène, mode d'action des UVA. En interagissant directement avec l'ADN, les UVB génèrent des photo-produits pouvant induire des mutations, la mort cellulaire voire même l'initiation de cancer de la peau. Lorsque la dose d'UV est importante, l'activation de la protéine p53 permet d'induire la mort cellulaire par apoptose. Mais lorsqu'une mutation intervient sur le gène p53, les cellules perdent leur capacité à rentrer en apoptose et peuvent entraîner une prolifération tumorale. Les radiations UV accroissent l'expression de métalloprotéases dans l'épiderme et le derme, augmentant ainsi la dégradation des macromolécules de la matrice extracellulaire (Passeron and Ortonne, 2003). Les UVA induisent, quant à eux, chez les kératinocytes, l'expression de gènes responsables des phénomènes de photo-vieillessement et de photo-carcinogénèse. Ces UVA agissent par l'intermédiaire des espèces réactives de l'oxygène qui forment des céramides. Ces dernières entraînent l'expression de protéines d'adhésion comme les ICAM-1. Ces protéines d'adhésion activent le facteur de transcription AP-2 jouant probablement un rôle important dans le phénomène de photo-vieillessement (Grether-Beck et al., 1996).

Des études ont montré que le tabagisme chronique était un facteur environnemental important impliqué dans le vieillissement cutané. Du point de vue histologique, la couche cornée est déshydratée par la fumée de tabac et entraînerait une diminution de l'épaisseur de cette couche. Du point de vue métabolique, les protéines de la matrice extracellulaire sont davantage dégradées par les métalloprotéases et leur synthèse est diminuée. Des études *in vitro* sur des cultures de fibroblastes dermiques humains ont permis de montrer des altérations quantitatives et qualitatives provoquées par la fumée de cigarette (Yin et al., 2000).

III. 4. Les produits à base de microalgues

Les microalgues sont donc de vrais réservoirs de molécules actives pour le domaine dermo-cosmétique. En France, des industriels du monde de la cosmétique comme Louis Vuitton Moët Hennessy et Daniel Jouvance ont développé des systèmes de culture de microalgues. Les produits cosmétiques à base de microalgues contiennent soit un extrait de biomasse soit des molécules purifiées.

Des extraits de *Chlorella vulgaris* sont présents dans différentes crèmes. En effet, Ecocentric a ajouté cet extrait dans son produit Patyka dont les actions sont la restructuration du collagène et la redensification des tissus conjonctifs contribuant à raffermir le contour des yeux. La marque Garancia a incorporé cet extrait dans son produit « Crème de nuit concentré, anti-rougeurs, anti-âge » dont les actions sont anti-âge et anti-rongeur. Codif technologie naturelle a développé un produit Dermochlorella D contenant un extrait de *Chlorella vulgaris* dont les vertus sont des effets raffermissant et correcteur des imperfections. Algotherm, dans sa gamme Algoessential, a rajouté cet extrait pour des produits impliqués dans la prévention du vieillissement cutané.

Porphyridium cruentum, qui comme détaillé dans la partie I.3 présente de nombreux effets biologiques, est utilisé sous forme d'extrait par différents industriels. En effet, Algotherm dans sa gamme de produit Algoessential, en plus de l'extrait de *Chlorella vulgaris* a ajouté celui de *Porphyridium cruentum* pour des produits ayant des effets anti-rougeurs. Garancia a incorporé cet extrait dans son produit « Bal de masque des sorciers liftant hydratant », un masque qui hydrate et repulpe la peau. Algologie a utilisé le milieu de culture conditionné de *Porphyridium cruentum* dans des crèmes ayant des propriétés hydratante, nourrissante, protectrice et stimulant le renouvellement cellulaire.

Des extraits de la cyanobactérie *Phormidium Persicinum* sont ajoutés par Algotherm dans sa gamme de produit Algotime expert en Algoblanc dont les propriétés sont le lissage de

la peau. Codif Technologie naturelle utilise cet extrait dans son produit « Phormiskin Bioprotech G » dont les vertus sont des effets anti-âges. Ecocentric a aussi mis cet extrait dans son produit « mask supreme Antonia Burell » qui agit sur la sénescence de la peau en stimulant la synthèse de thiorédoxine qui est une enzyme oxydoréductase.

Des extraits de *Arthrospira platensis*, en plus d'être présents dans les compléments alimentaires, sont retrouvés dans quelques préparations dermo-cosmétiques. La marque Labiomer a intégré cet extrait de microalgue dans ses gammes « anti-âge Algae repair » et « nourrissant, Huile de Spiruline » dont les propriétés sont l'activation des synthèses de collagène et d'élastine plus une vertu nourrissante.

Quant aux brevets, des sociétés en ont déposé pour de futures applications. Par exemple, la société Solazyme (San Francisco, Etats-Unis) a déposé une composition cosmétique contenant l'exopolysaccharide des genres de *Parachlorella* et d'autres biomasses provenant de *Chlorella protothecoides*. Une autre composition a été déposée par Terravia Holding (San Francisco, Etats-Unis) contenant de la biomasse et des huiles de microalgues. Givaudan (Suisse) développe un produit à base d'extrait de *Phaeodactylum tricornutum* riche en lipide comme agent anti-âge (Mourelle et al., 2017).

Ainsi, les microalgues sont des micro-organismes devenus intéressants pour le monde industriel pour de nombreuses raisons. Tout d'abord, ces micro-organismes sont une réserve importante de biopolymères comme des protéines, des lipides ou des polysaccharides. Cette diversité de biopolymères ouvre un champ important d'application pour ces microorganismes. En effet, leur richesse lipidique permet de les utiliser dans le domaine des biocarburants par exemple et dans les compléments alimentaires. Les polysaccharides, de par leurs propriétés particulières, peuvent être utilisés pour leurs activités biologiques mais aussi pour leurs propriétés rhéologiques. Enfin, les protéines issues de microalgues sont de plus en plus intéressantes pour être une source protéique alternative aux protéines animales. La culture de ces microalgues est de plus en plus maîtrisée, mais certaines espèces potentiellement intéressantes restent difficile à développer à l'échelle industrielle. Au regard des consommateurs, les microalgues commencent à prendre une place dans notre société notamment avec le fort développement de complément alimentaire à base d'*Arthrospira platensis*. Cependant, certaines personnes restent méfiantes devant ces microorganismes qui sont aussi connus pour produire des substances toxiques.

Objectifs de ces travaux

C'est dans ce contexte présenté dans l'étude bibliographique que les objectifs de ces travaux s'inscrivent.

Les objectifs principaux de cette thèse sont d'obtenir des polysaccharides de faible poids moléculaire et d'identifier une voie de valorisation dans le domaine de la dermo-cosmétique avec une application anti-âge pour des EPS issus de microalgues.

La première partie de ces travaux sera donc de développer une méthode de dépolymérisation pour réduire la taille des EPS, qui sera applicable aux EPS de microalgues du projet et qui devra être industriellement transposable. La masse obtenue souhaitée sera de 50 kDa afin de faciliter le passage des barrières biologiques. Les EPS dépolymérisés seront ensuite caractérisés d'un point de vue biochimique avec l'estimation de leurs masses moléculaires, leurs contenus en groupements sulfates, protéines et acides uroniques afin d'établir une possible relation structure-activités biologiques.

La seconde partie consistera à évaluer l'activité anti-âge de ces EPS en ciblant le vieillissement cutané avec comme objectifs d'accroître le contenu en macromolécules du derme comme le collagène et l'acide hyaluronique. Des tests *in vitro* seront réalisés sur deux modèles de fibroblastes dermiques humains issus de femmes de 20 ans et 46 ans et auront pour objectifs d'évaluer les effets des EPS sur les productions de collagène et d'acide hyaluronique. Des cinétiques enzymatiques évalueront les potentiels inhibiteurs des EPS vis-à-vis d'enzymes impliquées dans les dégradations de collagène comme les métalloprotéases et de l'acide hyaluronique comme les hyaluronidases. Pour terminer, une analyse des transcrits étudiera le mécanisme d'action de certains EPS sur la production de collagène par les fibroblastes dermiques humains.

Matériels
&
Méthodes

I. Matériels

Les EPS originaux, faisant l'objet de ces travaux ont été fournis par l'Institut Pascal de Clermont-Ferrand, dans le cadre de la thèse de Clément Gaignard (Gaignard, 2019). Dans ces travaux, les 6 souches productrices des EPS proviennent de la station Biologique de Roscoff et sont *Chrysothila dentata* CCAP 904/1, *Pavlova* sp. 3438, *Diacronema* sp. 3514, *Phaeodactylum tricornutum* 4633, *Glossomastix* sp. 3707 et *Synechococcus* sp. 2380. Ces microalgues ont été retenues pour leur forte capacité à produire des EPS et dont les compositions monosaccharidiques hétérogènes peuvent permettre d'établir des relations structures-fonctions. Un EPS issu de *Porphyridium cruentum* a été fourni par l'entreprise Algosource et sera l'EPS modèle de ce projet.

Ces EPS ont été fournis tout au long de ce projet en quantité limitée hormis pour l'EPS modèle. Les compositions monosaccharidiques de ces EPS ont été déterminées dans le cadre de la thèse de Clément Gaignard par une analyse en chromatographie ionique. Toutes ces informations sont reportées dans le tableau 5 ci-dessous (Gaignard, 2019).

Tableau 5 : Composition monosaccharidique obtenue en chromatographie ionique des EPS du projet.

Microalgues produisant les EPS	Date d'arrivée	Masse	Monosaccharides et acides uroniques (%)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Janvier 2017	20 g	<p> Glc 14 % GlcA 3 % Xyl 39 % Gal 44 % </p>
<i>Chrysothila dentata</i> CCAP 904/1	Février 2017	0,8 g	<p> Man 10 % Gal 33 % Xyl 17 % Ara 36 % GlcA 4 % </p>
<i>Pavlova</i> sp. 3438	Juin 2017	1 g	<p> Rha 47 % Gal 27 % Glc 11 % Ara 5 % GlcA 5 % </p>
<i>Diacronema</i> sp. 3514	Juillet 2017	1 g	<p> Rha 33 % Gal 26 % Xyl 5 % Glc 15 % Ara 17 % GlcA 4 % </p>
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> 4633	Septembre 2017	1 g	<p> Ara 13 % Gal 31 % Xyl 10 % Glc 42 % GlcA 4 % </p>
<i>Glossomastix</i> sp. 3707	Septembre 2017	1 g	<p> Gal 21 % GalA 2 % GlcA 6 % Rha 31 % Fuc 40 % </p>
<i>Synechococcus</i> sp. 2380	Janvier 2018	1 g	<p> Fuc 24 % Gal 38 % Glc 38 % </p>

Avec : Man : Mannose ; Glc : Glucose ; Gal : Galactose ; Rha : Rhamnose ; Fuc : Fucose ; Xyl : Xylose ; Ara : Arabinose ; Rib : Ribose ; GlcA : Acide glucuronique ; GalA : Acide galacturonique.

Les capacités d'échange de protons des résines cationiques fortes testées pour dépolymériser l'EPS modèle sont rassemblés dans le tableau 6 :

Tableau 6 : Capacité d'échange d'ions des résines cationiques fortes.

Nom	Capacité d'échanges d'ions	Taille des particules	T° maximale de travail	Fournisseurs
DOWEX 55 WX 8	1,7 eq/L	149 µm	Non renseigné	Sigma aldrich
DOWEX 88	1,8 eq/L	500-600 µm	93 °C	
Amberliste FPC23H	2,2 eq/L	580-800 µm	135 °C	
Amberlyst 15	4,7 eq/L	< 300 µm	120 °C	

Les colonnes de séparation utilisées sont des colonnes TSK-Gel de marque TOSOH achetées chez Interchim (France) dont les caractéristiques sont synthétisées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Caractérisations des colonnes de gel-perméation.

Nom	Longueur	Diamètre interne	Taille des pores	Taille des particules	Fournisseur
TSK-G5000PW	30 cm	7,5 mm	100 nm	17 µm	Fournisseur Interchim
TSK-G4000PW			50 nm		
TSK-G3000SW			25 nm	10 µm	
TSK-G2000SW			12 nm	10 µm	
TSK-Super SW2000SW		4,6 mm	4 µm		

Les lignées cellulaires proviennent d'ATCC localisé à Manassas aux Etats-Unis. Il s'agit de deux lignées de fibroblastes dermiques humains référencées **CCD-1059Sk** (ATCC® CRL-2072™) et **CCD-1090Sk** (ATCC® CRL-2106™) dont les numéros de lots sont respectivement 62062292 et 204756. Elles sont issues respectivement **de femmes de 20 ans** et **de 46 ans**. Le milieu de culture est l'« Eagle's Minimum Essential Medium » (EMEM) provenant de chez ATCC. Le sérum de veau fœtal (SVF) provient de chez Eurobio (France) et a été préalablement décomplémenté par un chauffage à 56 °C pendant 30 min. L'antibiotique qui est un mélange de pénicilline et de streptomycine (10 000 U/ml pénicilline, 10 mg/ml streptomycine) est acheté auprès de Sigma Aldrich.

Les réactifs ayant servis aux tests de viabilité et de mortalité cellulaires ainsi qu'au dosage de collagène et les enzymes ont été obtenus auprès de Sigma Aldrich. Le test ELISA permettant de doser l'acide hyaluronique provient de la société Eurobio.

II. Méthodes

II. 1. Dépolymérisation par hydrolyse acide supportée d'EPS de microalgues

La dépolymérisation des EPS permet de diminuer la taille initiale importante de ces polymères afin de potentiellement augmenter leurs impacts sur des activités biologiques, faciliter leur passage dans les voies métaboliques et diminuer leur viscosité. La dépolymérisation mise au point dans ses travaux combine deux outils. Tout d'abord un prétraitement par haute pression est réalisé puis les EPS subissent une hydrolyse acide supportée à l'aide d'une résine cationique forte qui sera utilisée soit dans un système discontinu, soit dans un système circulaire fermé.

II. 1. a. Choix de la résine cationique

La dépolymérisation acide supportée se réalise à l'aide d'une résine cationique. Pour choisir ce support, différentes résines (Dowex 88, Dowex 50 WX8, Amberliste FPC23H et Amberlyst 15) dont les capacités d'échanges de protons sont comprises entre 1,7 eq/L et 4,7 eq/L ont été testées. Cette étude est menée avec l'EPS issu de *Porphyridium cruentum*. Pour cela, 6 g de résines, 4 ml d'eau et 1 ml de solution d'exopolysaccharide à 25 mg/ml sont placés pendant 5 h à 80 °C dans un tube en verre fermé hermétiquement. Une centrifugation pendant 5 min à 10 000 x g permet de récupérer la solution d'EPS qui est ensuite neutralisée à pH : 7 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 1 Molaire (M). En parallèle, une hydrolyse effectuée avec une solution d'HCl 1 M est faite dans les mêmes conditions et sera le témoin positif de cette étude.

II. 1. b. Le prétraitement des EPS par haute pression

Ce prétraitement a été réalisé à l'Institut Pascal de Clermont-Ferrand dans le cadre du projet ANR POLYSALGUE.

Cette étape a deux objectifs principaux : initier la dépolymérisation en diminuant la taille des EPS permettant de favoriser les interactions entre les polysaccharides et la résine cationique ; puis de réduire la viscosité des EPS diminuant ainsi les forces de frottements contre le support de l'hydrolyse acide supportée.

Pour cela, ce prétraitement se réalise par une haute pression produite par un broyeur haute pression TS HAIVA. Les EPS sont solubilisés dans l'eau ultrapure à une concentration de 20 mg/ml puis sont passés dans le broyeur réglé sur une pression de 2,7 kBars. La solution d'EPS est récupérée et le broyeur est nettoyé avec 10 ml d'eau ultrapure qui sont ensuite ajoutés à la solution d'EPS. Cette succession de passage est réalisée 4 fois. La solution d'EPS ainsi que

les eaux de rinçage sont rassemblées puis congelées à -80 °C avant d'être séchées par lyophilisation à l'aide du lyophilisateur Heto PowerDry OL 6000 de chez Thermo Electron Corporation.

II. 1. c. Hydrolyse acide supportée d'EPS de microalgues

L'hydrolyse acide supportée est réalisée à l'aide de la résine Amberlyst™ 15 DRY. Elle est caractérisée par une capacité protonique de **4,7 eq/l** de protons et peut résister jusqu'à une température de 120 °C (Dosuna-Rodríguez and Gaigneaux, 2012; Frija and Afonso, 2012). Cette résine fournit sous forme sèche est préalablement hydratée et nettoyée plusieurs fois par de l'eau ultrapure.

Les hydrolyses acides supportées sont réalisées soit dans un système batch soit dans un montage circulaire fermé. Les solutions d'EPS sont préparées à partir des formes natives ou prétraitées par haute pression (PTHP). Elles sont réalisées dans l'eau ultrapure à une concentration de 2 mg/ml pour les deux systèmes de dépolymérisation.

II. 1. c. i. Hydrolyse acide supportée à l'aide du système batch

Le système batch est formé d'une bouteille en verre contenant 10 g de résines et fermé hermétiquement (figure 29). 25 ml de solution d'EPS à 2 mg/ml sont ajoutés dans le système batch. Cette bouteille est ensuite placée dans une étuve (Corning) contenant un plateau générant une agitation orbitale. Le système est maintenu à une température de 80 °C et agité à 120 rpm durant toute l'hydrolyse. Pour déterminer le temps d'hydrolyse, des prélèvements de 500 µl sont réalisés au temps initial (t_0), puis après 24 h ($t_{24\text{h}}$), 48 h ($t_{48\text{h}}$) et 72 h ($t_{72\text{h}}$). Ils sont ensuite centrifugés à 10 000 x g pendant 5 min puis neutralisés à pH :7 par ajout d'une solution de NaOH 1 M. Ces prélèvements sont ensuite analysés pour suivre l'évolution du poids moléculaire en chromatographie liquide haute performance qui sera décrit dans la partie II.2.

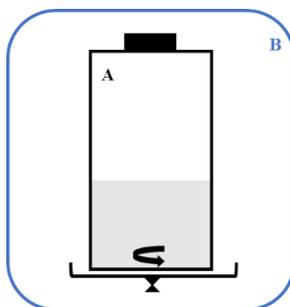


Figure 29 : Schéma représentant le réacteur discontinu (batch).

A : Bouteille contenant la solution d'EPS ; B : Etuve chauffante (80 °C).

Pour les productions d'EPS dépolymérisés en batch, aucun prélèvement n'est réalisé. A la fin de la réaction, les solutions d'EPS sont refroidies dans un bain de glace puis sont séparées de la résine par une centrifugation à 10 000 x g pendant 5 min à température ambiante. Les pH des solutions sont ensuite ajustés à 7 avec du NaOH 1 M puis sont congelées à -80 °C avant d'être séchées par lyophilisation à l'aide de l'appareil Cosmoc de Cryotec. Ces **EPS dépolymérisés en batch appelés « EPS-DPB »** dans la suite de ce manuscrit sont conservés dans des flacons hermétiques à température ambiante avant une utilisation ultérieure.

II. 1. c. ii. Hydrolyse acide supportée à l'aide du système circulaire fermé

Le système circulaire fermé est constitué d'une bouteille en verre fermée contenant 30 ml de solution d'EPS PTHP à 2 mg/ml, d'une colonne en verre (diamètre interne : 1 cm ; volume : 12 ml ; longueur : 15 cm) renfermant 10 g de résines et d'une pompe péristaltique (figure 30). La bouteille et la colonne sont maintenues à 80 °C respectivement par une plaque chauffante agitante (Radley) et une étuve (Thermocenter). La solution d'exopolysaccharide restant dans la bouteille est homogénéisée par une agitation magnétique à 120 rpm. La circulation de la solution d'exopolysaccharide se fait à un débit de 10 ml/min. Comme précédemment, le temps d'hydrolyse est déterminé en suivant la réaction à l'aide de prélèvements de 500 µl à t_0 , $t_{24\text{ h}}$, $t_{48\text{ h}}$ et $t_{72\text{ h}}$ qui sont ensuite centrifugés, neutralisés puis analysés en chromatographie liquide haute performance.

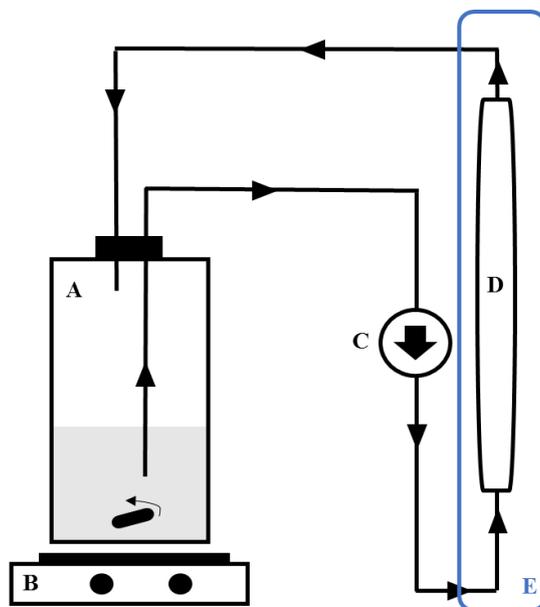


Figure 30 : Schéma représentant le réacteur circulaire fermé.

A : Bouteille contenant la solution d'EPS ; B : Plaque d'agitation chauffante (80 °C) ; C : Pompe péristaltique ; D : Réacteur à lit fixe (colonne) ; E : Etuve chauffante (80 °C).

Pour les productions d'EPS dépolymérisés dans le montage circulaire fermé, aucun prélèvement n'est réalisé. A la fin de la réaction, les solutions d'EPS sont récupérées et les systèmes sont nettoyés par 10 ml d'eau ultrapure qui sont ajoutés aux solutions d'EPS finales. Les pH des solutions sont ensuite ajustés à 7 avec du NaOH 1 M puis sont congelées à -80 °C avant d'être séchées par lyophilisation à l'aide de l'appareil Cosmoc de Cryotec. **Ces EPS dépolymérisés à l'aide d'un montage circulaire fermé appelés « EPS-DPC »** dans la suite de ce manuscrit sont conservés dans des flacons hermétiques à température ambiante avant une utilisation ultérieure.

II. 2. Caractérisations biochimiques des EPS du projet

Les 4 types des EPS du projet, à savoir les EPS natifs, PTHP, DPB et DPC sont caractérisés d'un point de vue biochimique afin d'essayer de mettre en évidence des relations structures-fonctions. Pour cela, les masses moyennes en poids (M_w), les masses moyennes en nombre (M_n) et les indices de polydispersités (I) sont déterminés par deux méthodes chromatographiques d'exclusion stérique, une couplée à une triple détection et l'autre à un réfractomètre permettant de mesurer l'indice de réfraction (RID). Les protéines, les groupements sulfates ainsi que les acides uroniques sont dosés par des dosages colorimétriques.

II. 2. a. Détermination des masses moyennes en poids (M_w), des masses moyennes en nombre (M_n) et des indices de polydispersités (I)

Les déterminations des M_w et des M_n sont réalisées à l'aide de deux méthodes chromatographiques liquide haute performance (HPLC). La première méthode est couplée à une triple détection et la seconde à une détection RID. Dans les deux cas, la séparation est réalisée par des colonnes à exclusion stérique qui permettent de séparer les molécules en fonction de leur poids moléculaire et les formules utilisées pour déterminer ces paramètres structuraux sont les suivantes (Ye et al., 2009) :

- La masse moyenne en poids (M_w) :

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

- La masse moyenne en nombre (M_n) :

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

- L'indice de polydispersité (I) :

$$I = M_w / M_n$$

Où N_i est le nombre de moles des espèces de polymères et M_i est le poids moléculaire des espèces du polymère.

II. 2. a. i. Mesure des M_w , M_n et I par chromatographie liquide haute performance couplée à une triple détection

Ces analyses ont été réalisées par le laboratoire Polymère Biopolymère Surface (PBS) de Rouen dans le cadre du projet ANR POLYSALGUE.

Cette technique de chromatographie couple une méthode de séparation par exclusion stérique à une triple détection composée d'un diffuseur de lumière multi-angles (MALS) (Down HELEOS II, Wyatt Technology, CA, USA), un détecteur de viscosité (VD) (Viscostar II, Wyatt Technology, CA, USA) et un RID (RID 10 A Shimadzu, Japon). La séparation est réalisée par deux colonnes d'exclusion stérique, OHPAK SB 804 et OHPAK SB 806 HQ (Shodex) montées en série.

Les EPS, sous forme lyophilisée, sont solubilisés pour former une préparation à 20 mg/ml dans l'éluant, qui est une solution de nitrate de lithium (LiNO_3) à une concentration de 0,1 M. 100 μl de cette solution polysaccharidique sont injectés dans le système chromatographique et élués à un débit de 0,5 ml/min. Les différents paramètres sont ensuite calculés avec les formules précédentes.

II. 2. a. ii. Mesure des M_w , M_n et I par chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par RID

- Détermination des colonnes de séparation

Pour suivre les dépolymérisations il est nécessaire de séparer les polymères de haut et de bas poids moléculaire. Pour cela, différentes combinaisons de colonnes gel-perméation sont testées. Pour rappel, les caractérisations de ces colonnes sont rassemblées dans le tableau 7. Les différents montages sont : une TSK-G3000SW et une TSK-G2000SW ; l'ajout d'une colonne TSK-SuperSW2000 et une TSK-G5000PW associée à une TSK-G4000PW. Le choix a été effectué en séparant une gamme de pullulane dont la taille est comprise entre 0,342 et 806 kDa (Sigma-Aldrich). Les éluants sont l'acétate d'ammonium à 0,1 M pour les colonnes TSK-G3000SW, TSK-G2000SW et SuperSW2000 et le nitrate de sodium à 0,1 M pour les TSK-G5000PW et TSK-G4000PW.

20 μl de standard de pullulane à une concentration de 2 mg/ml sont injectés dans le système d'analyse et sont élués à un débit de 0,4 ml pour les deux premiers montages et 0,8

ml/min avec le montage TSK-G5000PW et TSK-G4000PW. La détection par RID se fait à 30 °C.

- Suivis des dépolymérisations par HPLC couplé au RID

Ce système est utilisé pour suivre l'évolution des M_w , M_n et I des dépolymérisations à l'aide des deux systèmes développés et pour caractériser les différents EPS du projet.

Pour cela, une solution d'EPS à une concentration de 2 mg/ml est préparée dans de l'eau ultrapure. Le système d'analyse est composé d'une HPLC 1260 Infinity équipé d'un détecteur RID de chez Agilent Technologies (Santa Clara, Californie) et de deux colonnes d'exclusion stérique TSK-G5000PW et TSK-G4000PW branchées en série.

20 µl de la solution d'EPS à 2 mg/ml sont injectés dans le système d'analyse et les échantillons sont élués par une solution de nitrate de sodium à une concentration de 0,1 M et à un débit de 0,8 ml/min. La détection par RID se fait à 30 °C. Les standards de poids moléculaire sont une gamme de pullulane dont la taille est comprise entre 0,342 et 806 kDa.

II. 2. b. Taux d'hydrolyse par le dosage des sucres réducteurs

Durant la détermination du choix de la résine, le suivi d'hydrolyse a été effectué par le dosage des sucres réducteurs à l'aide de la méthode du 3,5-DiNitroSalicylate (DNS). Le principe de ce dosage (figure 31) repose sur la réduction à chaud et en milieu alcalin du DNS (chromophore jaune) en 3-amino-5-nitrosalicylate (chromophore rouge orangé) par les glucides réducteurs présents dans la solution analysée.

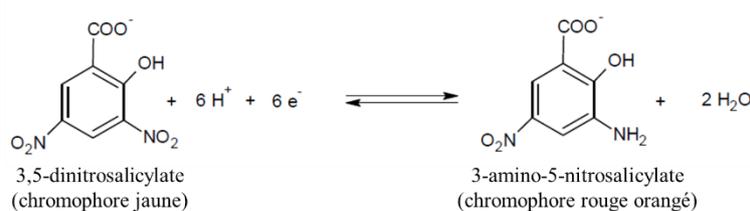


Figure 31 : Principe du dosage des sucre réducteurs par le DNS.

20 µl d'échantillons à 5 mg/ml et 20 µl de réactifs DNS à 10 mg/ml (3,5-DNS 10 mg/ml (m/v), tartrate double sodium potassium 300 mg/ml (m/v), NaOH 2 M, H₂O qsp 1L) sont ajoutés dans un vial en verre et chauffés pendant 10 min à 100 °C à l'aide d'une plaque chauffante (Radley). Le vial est ensuite refroidi pendant 5 min dans un bain de glace et 200 µl sont ajoutés. Après une agitation, 200 µl sont déposés dans un puit d'une microplaque 96 puits

et l'absorbance est mesurée à $\lambda = 540$ nm. Une calibration est réalisée dans les mêmes conditions en utilisant du glucose dont les concentrations sont comprises entre 0 et 2 mg/ml.

II. 2. c. Dosage des groupements sulfates

Les groupements sulfates sont dosés par la méthode colorimétrique de l'Azure A développée par Jacques & al (1968). Son principe (figure 32) repose sur le fait que le réactif Azure A (3-amino-7-(diméthylamino)phénouthizin-5-ium chloride) se complexe en phase aqueuse avec les groupements sulfates pouvant être présents sur les polysaccharides. La réaction crée une couleur rose-violet, due à la présence d'un chromophore dont l'absorbance est mesurée à $\lambda = 535$ nm.

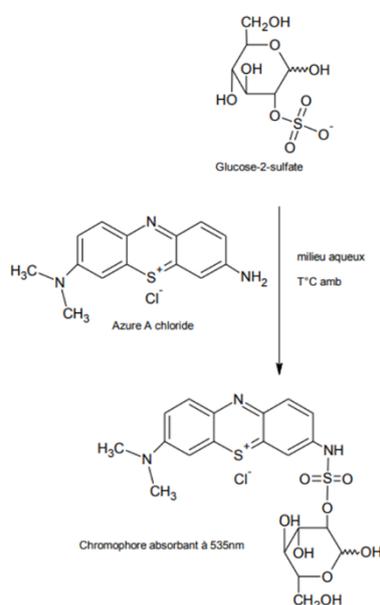


Figure 32 : Mécanisme réactionnel du dosage des groupements sulfates par le réactif Azure A (Jaques et al., 1968).

Ce dosage est réalisé dans une microplaque 96 puits dans laquelle 20 μ l de solutions à doser et 200 μ l de réactif Azure A à une concentration de 10 mg/l sont déposés dans chaque puits. L'absorbance est directement mesurée à $\lambda = 535$ nm avec un spectrophotomètre de microplaque 96 puits (Fluostar Omega). Une calibration est faite dans les mêmes conditions à l'aide d'une gamme de dextrane sulfate contenant initialement 17 % de soufre.

II. 2. d. Dosage des protéines

Le dosage de protéines est réalisé par la méthode de Lowry couplée au réactif de Folin (Fryer et al., 1986; Lowry et al., 1951). Cette méthode repose sur deux réactions. Tout d'abord, les protéines qui possèdent au moins 4 liaisons peptidiques réagissent avec les ions cuivre II (réactif de Gornall) pour former un complexe bleu-violet (figure 33). Puis une réaction avec un

réactif phosphotungstomolybdique (réactif de Folin-Ciocalteu) composé d'un mélange de tungstate de sodium et de molybdate de sodium dans de l'acide phosphorique réduit les acides aminés aromatiques comme la tyrosine et le tryptophane pour former un coloré bleu foncé dont l'absorbance est mesurée entre $\lambda = 650$ et $\lambda = 750$ nm.

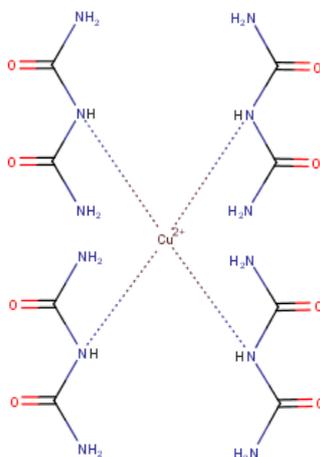


Figure 33 : Réaction entre les liaisons peptiques et Cu²⁺ présent dans le réactif de Gornall.

3 solutions sont nécessaires pour réaliser le réactif de Gornall : une solution de tartrate double potassium sodium à 2 %, une préparation de sulfate de cuivre à 1% et une solution de carbonate de sodium à 2 % préparée dans du NaOH 0,1 M. Ces solutions sont assemblées dans une proportion de 1 : 1 : 100 pour former le réactif de Gornall.

Ce dosage est réalisé dans une microplaque 96 puits. Tout d'abord, 25 μ l de solution à doser et 75 μ l de réactif de Gornall sont ajoutés dans un puits et incubés pendant 20 min, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Ensuite, 125 μ l de réactif de Folin-Ciocalteu, préalablement dilué au 20^{ème} dans de l'eau ultrapure, sont ajoutés et incubés pendant 30 min, à température ambiante et à l'abri de la lumière. A la suite de cela, l'absorbance est mesurée à $\lambda = 750$ nm avec un spectrophotomètre de microplaque 96 puits (Fluostar Omega). Une calibration est réalisée dans les mêmes conditions à l'aide d'une gamme d'albumine de sérum bovin comprise entre 0 et 500 μ g/ml.

II. 2. e. Dosages des acides uroniques

La composition en acides uroniques des EPS a été déterminée par la méthode de dosage colorimétrique développée par Blumenkrants & Asboe-Hansen (1973) et modifiée par Filisetti-Cozzy & al. (1991) (figure 34). Tout d'abord, en présence d'acides minéraux concentrés et à chaud, les acides uroniques subissent une déshydratation interne poussée puis une cyclisation aboutissant à la formation de dérivés d'acide 5-formylfuroïque. Dans un second temps, les

acides uroniques réagissent avec le *mé*ta-hydroxydiphényle (mHDP) pour former un chromophore de couleur rose absorbant à $\lambda = 525$ nm.

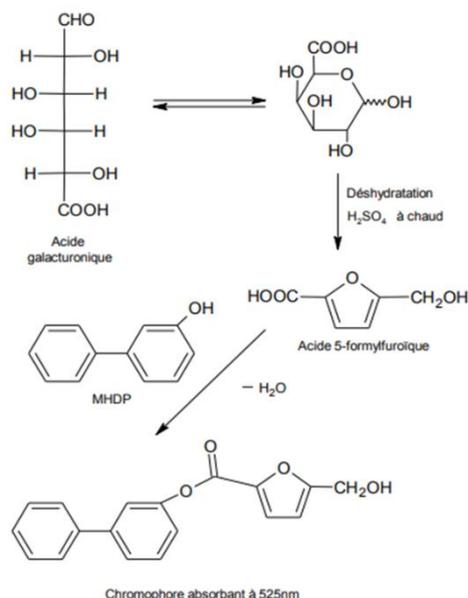


Figure 34 : Mécanisme réactionnel du dosage des acides uroniques (Blumenkrantz and Asboe-Hansen, 1973; Filisetti-Cozzi and Carpita, 1991).

Le dosage est réalisé à l'aide de 3 solutions : une préparation d'acide sulfamique à 4 M réalisée dans l'eau ultrapure ; une de tétraborate de sodium à 0,075 M faite dans l'acide sulfurique pur et une de mHDP à 0,15 % dans l'eau ultrapure. La réaction est faite dans des vials en verre dans lesquels sont placés 200 μ l de solution à doser, 20 μ l d'acide sulfurique et 1,2 ml de tétraborate de sodium. Ce mélange est incubé pendant 20 min à 80 °C puis 80 μ l de mHDP sont ajoutés. Après une forte agitation réalisée par un vortex, 200 μ l de cette réaction sont transférés dans un puits d'une microplaque 96 puits pour mesurer l'absorbance à $\lambda = 525$ nm avec un spectrophotomètre de microplaque 96 puits (Fluostar Omega). Une calibration est réalisée dans les mêmes conditions en utilisant de l'acide glucuronique dont les concentrations sont comprises entre 0 et 500 μ g/ml.

II. 3. Evaluation du potentiel anti-âge d'EPS de microalgues

II. 3. a. Présentation des modèles cellulaires

Les lignées utilisées pour évaluer le potentiel anti-âge des EPS sont deux lignées de fibroblastes dermiques humains, **CCD-1059Sk** (ATCC[®] CRL-2072[™]) et **CCD-1090Sk** (ATCC[®] CRL-2106[™]) issues respectivement de femmes de **20 et 46 ans**. Dans la suite de ce mémoire, les lignées **CCD-1059Sk** et **CCD-1090Sk** seront notées respectivement **1059** et **1090**.

II. 3. b. Conditions de cultures des fibroblastes dermiques humains

Tout d'abord, les manipulations de ces lignées ont été réalisées en conditions stériles à l'aide d'un poste de sécurité microbiologique (PSM) de niveau 2. Les solutions en contact avec les cellules sont stérilisées avec des filtres de 0,20 µm (Sarstedt).

- Les milieux de cultures

Différents milieux permettent de cultiver et de réaliser les différents tests cellulaires. Tout d'abord, pour l'entretien et la mise en culture des cellules pour les tests, le milieu utilisé est l'**EMEM supplémenté par 10 % de SVF et 1 % d'antibiotiques** (streptomycine-pénicilline) et filtré sur 0,20 µm. Ce milieu sera nommé **milieu complet** dans la suite de ce mémoire. Un autre milieu composé uniquement d'**EMEM et 1 % d'antibiotiques** (streptomycine-pénicilline) filtré sur 0,20 µm sert aussi pour ces tests et sera nommé **EMEM + AB**.

- L'entretien des cellules

Les fibroblastes dermiques humains sont cultivés dans des flasques stériles de 75 cm² (Falcon) contenant 10 ml de milieu complet et sont maintenus à 37 °C sous une atmosphère à 5 % de CO₂ dans une étuve de culture cellulaire. Une fois le tapis cellulaire à confluence, c'est-à-dire quand l'ensemble du support de culture est recouvert de cellules, ces dernières sont détachées par une étape de trypsination.

Pour cela, le milieu complet est retiré puis le tapis cellulaire est lavé par 5 ml de tampon phosphate salin (PBS). Ce dernier est retiré et 2,5 ml de trypsine/EDTA à 2 X sont ajoutés pour décoller les cellules. La trypsine est une protéase clivant les protéines membranaires d'adhésion ce qui permet de détacher les cellules du support. Une fois le tapis décollé (environ après 5 min à 37 °C et 5 % de CO₂), 5 ml de milieu complet sont ajoutés afin de stopper l'action de cette enzyme. Les cellules sont récupérées par une centrifugation à 1200 rpm pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant est retiré et le culot cellulaire est suspendu dans 500 µl de milieu complet.

Les cellules sont soit remises en culture dans de nouvelles flaques contenant 10 ml de milieu complet soit ensemencées dans des plaques de cultures pour les différents tests.

- Le dénombrement des cellules

Afin de déterminer le nombre de cellules présentes dans la suspension cellulaire, les fibroblastes dermiques humains sont comptés à l'aide de la cellule de Mallasez. Le bleu de trypan sert à dissocier les cellules mortes et vivantes. En effet, les cellules vivantes ont leurs

membranes plasmiques intactes ce qui empêche la pénétration du bleu de trypan dans la cellule. En revanche, pour les cellules mortes, dont la membrane plasmique est endommagée, le bleu de trypan rentre dans les cellules et les colorent permettant ainsi de les différencier des cellules vivantes (Jauregui et al., 1981).

Dans un puits de microplaque 96 puits, 20 μ l de suspension cellulaire sont ajoutés au 80 μ l de bleu de trypan. Après un pipetage-refoulement, 20 μ l de ce mélange sont déposés sur la lame de Mallasez afin d'effectuer le comptage et de déterminer la concentration cellulaire initiale.

II. 3. c. Effets d'EPS de microalgues sur la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est évaluée par le test MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Mosmann, 1983). Le principe de ce dosage repose sur la réduction du MTT en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules viables. Le formazan sous forme de cristaux est dissout par ajout du diméthyle sulfoxyde (DMSO) afin de mesurer son absorbance à $\lambda = 550$ nm qui est proportionnelle au nombre de cellules viables.

Ce test se déroule sur 4 jours. Au jour 1, les fibroblastes dermiques humains sont trypsinés et dénombrés afin d'être mis en culture dans des microplaques de 96 puits stériles (Falcon). Les cellules sontensemencées dans le milieu complet à une concentration de 5×10^4 cellules/ml et dans un volume final de 100 μ l. Après 24 h d'attachement, soit au jour 2, le milieu complet est remplacé par 100 μ l de milieu EMEM+AB contenant soit les EPS à une concentration de 100 μ g/ml soit les témoins de productions de collagène et d'acide hyaluronique qui sont respectivement l'acide hyaluronique à une concentration de 1000 μ g/ml et le TGF- β 1 à une concentration de 0,01 μ g/ml (Donejko et al., 2015; Tanimoto et al., 2004). Il est à noter que les EPS sont préalablement solubilisés dans de l'eau ultrapure à une concentration de 5 mg/ml. Un témoin négatif est réalisé dans lequel les cellules sont traitées avec 100 μ l de milieu EMEM+AB. Après 48 h de traitement, soit au jour 4, 25 μ l d'une solution de MTT à une concentration de 5 mg/ml préparée dans le PBS stérile et filtré sur 0,20 μ m, sont ajoutés dans chaque puits. Les cellules sont incubées pendant 4 h à 37 °C et 5 % de CO₂ puis le milieu est retiré et 200 μ l de DMSO sont ajoutés afin de solubiliser les cristaux de formazan produit. Après une incubation de 10 min à 37 °C et 5 % de CO₂, l'absorbance est mesurée à $\lambda = 550$ nm à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaque 96 puits (Fluostar Omega).

La viabilité cellulaire exprimée en pourcentage est calculée à l'aide de la formule ci-dessous :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{\text{DO des cellules exposées aux EPS}}{\text{DO des cellules non exposées (témoin négatif)}} \times 100$$

Pour chaque échantillon, l'expérience a été réalisée 3 fois avec 8 réplicats par série (N : 3, n = 24). Une étude statistique a été réalisée à l'aide du test-t de student avec le logiciel Origin 6.

II. 3. d. Effets d'EPS de microalgues sur la mortalité cellulaire

La mortalité cellulaire est évaluée avec le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH). Cette enzyme cytoplasmique est un marqueur de dommage de la membrane cellulaire. En effet, dans les conditions physiologiques, la LDH est présente dans le cytoplasme des cellules. Mais lorsque la membrane cellulaire est endommagée, par exemple en cas de nécrose, les composants cytoplasmiques, dont la LDH se retrouve dans le surnageant cellulaire. Ainsi, l'activité enzymatique de la LDH peut être mesurée dans les surnageants cellulaires afin d'évaluer la cytotoxicité de molécules. Le kit Cytotoxicity Detection (LDH) provenant de Sigma-Aldrich et fabriqué par Roche a permis de réaliser ce dosage. Le principe est représenté par la figure 35. Ce kit contient deux réactifs : le premier est un mélange de Diaphorase et de NAD⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide oxydé) et le deuxième est une solution de coloration composée de chlorure d'iodotétrazolium (INT) et de lactate de sodium. Le réactif final est composé de 250 µl du premier réactif et 11, 250 ml du deuxième réactif.

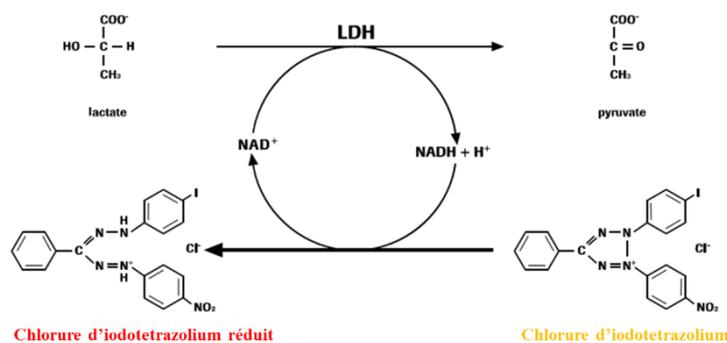


Figure 35 : Principe du dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase (manuel du kit).

Tout d'abord, la LDH libérée réduit le NAD⁺ en NADH + H⁺ par l'oxydation du lactate en pyruvate. Dans un second temps, les 2 protons du NADH + H⁺ sont transférés au sel de chlorure d'iodotétrazolium, initialement de couleur jaune, ce qui a pour conséquence de le réduire et de former un sel de couleur rouge dont l'absorbance est mesurée à $\lambda = 490 \text{ nm}$.

Ce test se déroule sur 4 jours. Le jour 1 est identique à celui du protocole du MTT. Au jour 2, les cellules sont exposées aux mêmes solutions d'EPS que pour le dosage MTT à l'exception que le volume final dans le puits est de 200 µl. Le témoin négatif est identique au dosage précédent. Un témoin positif de mortalité cellulaire est réalisé avec 100 µl d'une solution de triton 1X. Après 48 h de traitement, les microplaques 96 puits sont centrifugées à 250 x g pendant 10 min à température ambiante. 100 µl de surnageant cellulaire sont transférés dans une nouvelle microplaque et 100 µl de réactif final sont ajoutés, puis la microplaque est incubée pendant 30 min, à 25 °C et à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à $\lambda = 490$ nm à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaque 96 puits (Fluostar Omega). Le test est aussi réalisé à l'aide du milieu EMEM + AB qui n'a pas été en contact avec les cellules et sera nommé milieu seul dans la formule.

La LDH libérée, en pourcentage, traduisant de la mortalité cellulaire, est calculée à l'aide de la formule ci-dessous :

$$\text{LDH libérée (\%)} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO milieu seul}}{\text{DO témoin positif} - \text{DO milieu seul}} \times 100$$

L'expérience, comme préconisé par le kit, a été réalisée une fois avec 4 réplicats (n : 4). Une étude statistique a été réalisée à l'aide du test-t de student avec le logiciel Origin 6.

II. 3. e. Dosage de collagène intracellulaire

Le dosage utilise le colorant Sirius red (Tullberg-Reinert and Jundt, 1999) initialement conçu pour la coloration des fibres de collagène présentes dans les tissus. Le Sirius red est un colorant anionique comprenant des groupements d'acide sulfonique qui réagissent avec les groupements basiques des fibres de collagène (Junqueira et al., 1979).

Ce dosage est réalisé sur 4 jours. Au jour 1, les cellules sont trypsinées, dénombrées etensemencées dans des plaques 24 puits stériles (Falcon) à une concentration finale de 5×10^4 cellules/ml dans un volume final de 500 µl de milieu complet. Après 24 h d'attachement, le milieu complet est remplacé par 500 µl de milieu EMEM + AB contenant les EPS à une concentration de 100 µg/ml. Un témoin négatif est réalisé dans lequel les cellules ne sont pas exposées aux EPS. Le témoin positif est l'acide hyaluronique testé à une concentration de 1000 µg/ml. Après 48 h d'exposition, soit au jour 4, le dosage du collagène est effectué. Il est à noter que les conditions stériles ne sont pas nécessaires pour le réaliser. Pour cela, les milieux de culture sont récupérés et conservés à -80 °C afin d'être utilisés pour le dosage de l'acide hyaluronique qui sera décrit dans la partie II.3.f. Les tapis cellulaires sont ensuite lavés 2 fois

par 500 µl de PBS non stérile puis 1 ml de solution de Bouin's (Sigma-Aldrich) est ajouté dans chaque puits afin de fixer les cellules pendant 1 h à température ambiante et sans agitation. Après cette incubation, la solution de Bouin's est retirée et le tapis cellulaire fixé est lavé par 2 lavages avec 500 µl d'eau ultrapure. 500 µl d'une solution de Sirius red à une concentration de 1 mg/ml préparée dans de l'acide picrique à 1,3 % (Sigma-Aldrich) sont ajoutés et incubés pendant 1 h à température ambiante et sous agitation modérée. Puis cette solution est retirée et le tapis cellulaire est lavé 2 fois par 500 µl d'eau ultrapure et 1 fois avec une solution d'HCl 0,01 M. Le colorant fixé est dissout par 250 µl du NaOH 0,1 M pendant 1 h à température ambiante et sous agitation. 200 µl sont ensuite transférés dans une microplaque 96 puits afin de mesurer l'absorbance à $\lambda = 550$ nm à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaque 96 puits (Fluostar Omega). Une gamme de collagène de type I est réalisée afin de déterminer la concentration en collagène présente.

La production de collagène par cellules, en pourcentage, est calculée avec la formule ci-dessous et tient compte de la viabilité cellulaire déterminée par le test MTT. Il est à noter qu'une gamme de calibration représentant la densité optique en fonction du nombre de cellules a été réalisée au préalable.

$$\text{Production de collagène (\%)} = \frac{[\text{Collagène par cellules}] \text{ échantillon} \times 100}{\text{Moyenne } [\text{Collagène par cellules}] \text{ témoin négatif}}$$

Les expériences ont été réalisées 3 fois avec 3 réplicats à chaque fois (N : 3 ; n : 9). Une étude statistique a été réalisée à l'aide du test-t de student avec le logiciel Origin 6.

II. 3. f. Dosage de l'acide hyaluronique extracellulaire

Les effets des EPS sur la production d'acide hyaluronique extracellulaire par les fibroblastes dermiques humains issus des femmes de 20 ans et 46 ans ont été évalués par un test ELISA. Pour cela, le kit « Hyaluronic acid plus ELISA » développé par Tecco® qui est un dosage dit sandwich a été utilisé. Ce kit contient une microplaque 96 puits où les puits sont recouverts d'une protéine de liaison de l'acide hyaluronique (HABP) sur laquelle l'acide hyaluronique présent dans les surnageants cellulaires se fixe. Une seconde HABP, cette fois-ci couplée à la peroxydase de Raifort (HRP) se lie à l'acide hyaluronique fixé à la première HABP. L'ajout du substrat de la HRP permet de créer une réaction dont l'absorbance du produit formé, mesurée à $\lambda = 405$ nm, est proportionnelle aux taux d'acide hyaluronique présent dans l'échantillon (Figure 36).

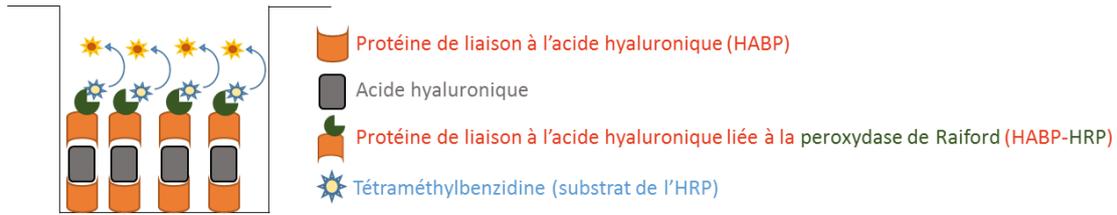


Figure 36 : Principe d'un dosage ELISA dit sandwich.

Les surnageants ayant servis pour ce dosage ont été récupérés lors de la première étape du dosage de collagène décrit dans la partie II.3.e. Les effets des exopolysaccharides à une concentration de 100 µg/ml sur la production d'acide hyaluronique ont été évalués. Le témoin positif de ce test est le TGF-β testé à une concentration de 0,01 µg/ml. Les surnageants sont centrifugés à 1200 rpm pendant 5 min afin d'éliminer les débris cellulaires puis dilués au 100^{ème} dans l'EMEM et dans le diluant présent dans le kit. Le dosage est ensuite réalisé en suivant les recommandations du kit. Rapidement, 100 µl de surnageant dilués au 100^{ème} sont ajoutés dans chaque puits de la microplaque. Après une incubation de 2 h à température ambiante, à l'abri de la lumière et sous agitation à 500 tours/min, les surnageants sont retirés et les puits sont lavés 3 fois par 350 µl de la solution de lavage fournie dans le kit. 100 µl de la solution de HABP-HRP sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 30 min à température ambiante, à l'abri de la lumière et sous agitation à 500 tours/min. Après cela, cette solution de HABP-HRP est retirée puis les puits sont lavés 5 fois par 350 µl de la solution de lavage fournie dans le kit. Enfin, 100 µl de solution de substrat de la HRP sont ajoutés et laissés pendant 30 min à température ambiante, à l'abri de la lumière et sous agitation à 500 tours/min. La réaction enzymatique est stoppée par l'ajout de 100 µl de solution d'arrêt à base d'HCl 1 M puis l'absorbance est mesurée à λ = 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaque 96 puits (Fluostar Omega). La calibration a été réalisée par une gamme de concentration d'acide hyaluronique comprenant les points suivants : 0 ; 15 ; 50 ; 150 ; 450 et 1000 ng/ml fournis dans le kit.

La concentration en acide hyaluronique a été calculée grâce à la formule ci-dessous :

$$Production\ acide\ hyaluronique\ par\ cellules\ (\%) = \frac{[Acide\ hyaluronique] \times 100}{Viabilité\ cellulaire\ (\%)}$$

L'expérience a été réalisée avec 3 surnageants provenant de 3 expériences indépendantes. Une étude statistique a été réalisée à l'aide du test-t de student avec le logiciel Origin 6.

II. 3. g. Analyse des transcrit par RT-qPCR

Afin d'étudier les effets de certains EPS sur les voies métaboliques impliquées dans la synthèse et dans la dégradation du collagène, une étude des transcrits par RT-qPCR (Reverse transcriptase- Polymerase Chain reaction quantitative) est réalisée. Elle s'effectue en deux étapes. La première est la réalisation d'une copie d'ARNm extrait des cellules en ADNc. La seconde est une réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) sur l'ADNc synthétisé qui permet d'amplifier un fragment d'ADN d'intérêt (Mullis et al., 1986).

Pour cette étude, les EPS choisis ont été les EPS DPB issus de *Glossomastix* sp. et *Synechococcus* sp. à une concentration de 100 µg/ml. Cette expérience préliminaire a été réalisée sur les fibroblastes dermiques humains 1059 (20 ans).

Les cellules sontensemencées dans des flasques de 75 cm² dans le milieu complet. Une fois le tapis cellulaire à confluence, il est exposé pendant 48 h à 10 ml de solution d'EPS-DPB préparé dans le milieu EMEM+AB. A la suite de cela, les cellules sont récupérées à l'aide d'une étape de trypsination. Le culot cellulaire formé est lysé et les ARNm sont extraits en suivant les recommandations du kit RNeasy® Plus Mini Kit. Les ADNc issus de ces ARNm sont obtenus par reverse transcription à l'aide du kit qScript® cDNA supermix de Quantabio. Les RT-qPCR sont réalisées avec le kit PerfeCta™ SYBR Green Fast Mix™, Low ROW. Les amorces choisies ont été fournies par OriGene Technologies et codent toutes pour des gènes humains dont les séquences sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Séquences des amorces humaines sélectionnées.

Symbole	Nom du gène	Séquences (5' vers 3')
TGF-β1	Facteur de croissance transformant- β1	-GACAACGTCAGGTTCTGGCTCA- -CCGCCACTTCTCTCCAAACT-
TGF-β1 BR1	Récepteur BR1 du TGF-β1	-TACCTGAACCCGTTGCTCTC- -GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA-
TGF-β1 BR2	Récepteur BR2 du TGF-β1	-GTCTGTGGATGACCTGGCTAAC- -GACATCGGTCTGCTTGAAGGAC-
SMAD 2	Protéine SMAD 2	-GGGTTTTGAAGCCGCTATCAGC- -CCAACCACTGTAGAGGTCCATTTC-
SMAD 7	Protéine SMAD 7	-TGTCCAGATGCTGTGCCTTCTT- -CTCGTCTTCTCCTCCAGTATG-
SMAD 4	Protéine SMAD 4	-CTACCAGCACTGCCAATTTC- -CCTGATGCTATCTGCAACAGTCC-
MMP 1	Métalloprotéase-1	-ATGAAGCAGCCCAGATGTGGAG- -TGGTCCACATCTGCTCTGGCA-
MMP 3	Métalloprotéase-3	-CACTCACAGACCTGACTCGGTT- -AAGCAGGATCACAGTTGGCTGG-
TIMP 1	Inhibiteur tissulaire 1 des MMP	-GGAGAGTGTCTGCGGATACTTC- -GCAGGTAGTGTGCAAGAGTC-
COL1A1	Collagène de type I chaîne α1	-GATTCCTGGACCTAAAGGTGC- -AGCCTCTCCATCTTTGCCAGCA-
COL 3A1	Collagène de type III chaîne α1	-TGGTCTGCAAGGAATGCCTGGA- -TCTTCCCTGGGACACCATCAG-
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG- -ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-

II. 3. h. Effets d'EPS de microalgues sur l'inhibition de la MMP-1 humaine

Cette réaction enzymatique est basée sur la dégradation d'un substrat qui est un peptide fluorescent, le Mca-(7-méthoxycoumarin-4-yl-acetyl)-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-(2,4-dinitrophenyl)-L- α,β -diaminopropionyl-Ala-Arg-NH₂ par la MMP-1 humaine. L'émission de fluorescence du groupement Mca-(7-méthoxycoumarin-4-yl-acetyl) est bloquée par la présence du cycle Dpa-(2,4-dinitrophenyl)-L- α,β -diaminopropionyl. L'hydrolyse entre les résidus glycine et Leucine par la MMP-1 permet de libérer le groupement Mca-(7-méthoxycoumarin-4-yl-acetyl) et augmente donc la fluorescence qui est mesurée à $\lambda_{\text{excitation}} = 330 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 390 \text{ nm}$ (Figure 37).

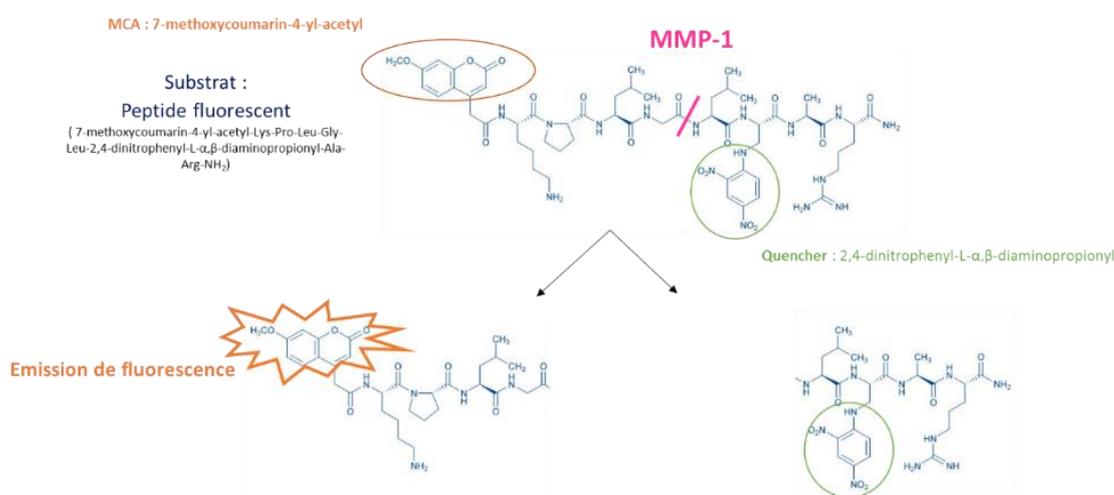


Figure 37 : Principe de la réaction enzymatique entre la MMP-1 et le peptide fluorescent.

La réaction enzymatique est réalisée dans une solution tampon à pH 7,5 composée de tricine à 50 nM, NaCl à 400 nM et CaCl₂ à 10 mM. Toutes les concentrations énoncées ultérieurement sont des concentrations finales dans le puits. Les EPS et l'inhibiteur de référence utilisé, le Piroxicam sont testés à une concentration 100 $\mu\text{g/ml}$, l'enzyme est utilisée à une concentration de 5 nM et la concentration du substrat est de 10 μM . Il est à noter que le tampon ayant servi à préparer la solution finale enzymatique contient en plus 0,1 % d'albumine de sérum bovin (BSA) afin de pallier à la dénaturation de la MMP-1 qui se produit en absence de BSA. 20 μl de solution enzymatique et 20 μl d'inhibiteur (EPS ou le piroxicam) sont incubés dans un puits d'une microplaque 96 puits et séparément du substrat pendant 10 min à 25 °C. Après cette incubation, 12,5 μl de substrat sont ajoutés et le volume est ajusté à 100 μl par le tampon de la réaction. La fluorescence est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaque 96 puits (Fluostar Omega) pendant 1 h à 25 °C. Un témoin négatif correspondant à la réaction sans enzyme est réalisé dans les mêmes conditions. Le pourcentage d'inhibition est calculé à l'aide de la vitesse initiale (v_i) correspondant aux pentes des courbes obtenues.

Le pourcentage d'inhibition est déterminé à l'aide de la formule ci-dessous :

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \left(\frac{v_i \text{ en présence de l'inhibiteur}}{v_i \text{ témoin négatif}} \right) \times 100$$

L'expérience est répétée 3 fois de manière indépendante. Une étude statistique a été réalisée à l'aide du test-t de student avec le logiciel Origin 6.

II. 3. i. Effets d'EPS de microalgues sur l'inhibition de la HYAL-I bovine

Cette réaction enzymatique est basée sur la mesure de la dégradation de l'acide hyaluronique par une hyaluronidase de type I bovine (HYAL-I). L'acide hyaluronique est clivé en petits fragments et en unité mono et disaccharidiques. La mesure de cette réaction enzymatique se fait en mesurant la turbidimétrie à $\lambda = 600$ nm qui traduit la présence d'acide hyaluronique non hydrolysé. Ainsi, une diminution de la turbidimétrie signifie une réduction de la concentration en acide hyaluronique sous forme native.

Plusieurs solutions sont nécessaires pour ce test :

- Une solution de hyaluronidase de type I bovine à une concentration initiale de 0,1 mg/ml préparée dans un tampon contenant 20 mM de phosphate de sodium, 77 mM de chlorure de sodium, 0,01 % de BSA et dont le pH est de 7.
- Une solution d'acide hyaluronique (substrat de la réaction), à une concentration initiale de 0,8 mg/ml, préparée dans un tampon de phosphate de sodium à 300 mM et de pH 5,35
- L'inhibiteurs de référence, l'héparine, ainsi que les EPS du projet préparés à une concentration de 5 mg/ml dans de l'eau ultrapure.
- Une solution d'acide albumine composée de 24 mM d'acétate de sodium, 79 mM d'acide acétique, 0,1 % de BSA et dont le pH est de 3,75.

Cette réaction est réalisée à 37 °C dans des tubes en verre fermés hermétiquement. 100 μ l de la solution enzymatique sont placés à 37 °C pendant 10 min puis 500 μ l de la solution d'acide hyaluronique et 40 μ l de la solution inhibitrice sont ajoutés à l'enzyme et incubés pendant 45 min à 37 °C. Un témoin négatif sans enzyme est réalisé dans les mêmes conditions expérimentales. Des prélèvements de 40 μ l sont effectués toutes les 2,5 min pendant 15 min puis toutes les 5 minutes jusqu'à 45 min et placés dans 200 μ l de solution d'acide albumine afin de mesurer la turbidimétrie à $\lambda = 600$ nm à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaque 96

puits (Fluostar Omega). Le pourcentage d'inhibition est calculé à l'aide de la vitesse initiale (v_i) correspondant aux pentes des courbes obtenues.

Le pourcentage d'inhibition est déterminé à l'aide de la formule ci-dessous :

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - \left(\frac{v_i \text{ en présence de l'inhibiteur}}{v_i \text{ témoin négatif}} \right) \times 100$$

L'expérience est répétée 2 fois de manière indépendante. Une étude statistique n'a donc pas pu être réalisée.

Résultats
&
Discussion

Partie 1

*Dépolymérisation d'EPS de
microalgues par hydrolyse
acide supportée*

Introduction

Les EPS de microalgues sont des polymères de haut poids moléculaire nécessitant une dépolymérisation pour potentiellement accroître leurs effets biologiques. Comme décrit dans l'étude bibliographique, plusieurs outils sont disponibles pour cliver ces molécules. **L'objectif de cette première partie est de mettre en place un protocole de dépolymérisation d'EPS de microalgues dont la transposition à une échelle industrielle puisse être réalisable.**

Un des moyens pour dépolymériser les EPS est la voie biologique avec notamment l'utilisation d'enzyme. Le principal avantage de cette méthode est la spécificité des sites de coupures permettant la génération de motifs glycosidiques contrôlés. Dans notre cas, les structures monosaccharidiques ne sont pas connues et nous recherchons une méthode applicable à l'ensemble des EPS. Il faudrait donc un temps de développement très important afin de mettre en évidence une ou plusieurs enzymes les dégradant. A cela s'ajoute le coût important de cette méthode orientant donc les activités biologiques recherchées vers des produits à haute valeur ajoutée.

La dépolymérisation peut être non biologique en utilisant des rayonnements électromagnétiques comme les micro-ondes, les ultrasons ou les rayons γ . Ils ont pour avantage d'être potentiellement applicables à nos EPS mais la transposition à l'échelle industrielle reste encore compliquée et onéreuse à ce jour.

Une autre voie non biologique est l'ajout d'espèce chimique comme des molécules radicalaires ou des acides. Cette addition induit une étape de purification ce qui pourrait augmenter le coût de la méthode et la perte de matière. De plus, les acides sont souvent utilisés à de fortes concentrations amplifiant l'usure des réacteurs et rendant donc la transposition à l'échelle industrielle plus onéreuse. Cependant, l'hydrolyse acide est une méthode très efficace pour les polysaccharides, simple à mettre en place et applicable à l'ensemble des EPS. Une des alternatives à l'hydrolyse acide en milieu homogène, est de se servir de support de protons comme des résines afin de diminuer l'usure des réacteurs, favoriser la transposition à l'échelle industrielle et éviter la production de sels dans l'échantillon. En revanche, comme l'hydrolyse acide homogène, cette méthode est aléatoire et peut entraîner une désulfatation des échantillons.

Au vu des différentes méthodes disponibles, avec chacune leurs avantages et leurs inconvénients mais aussi avec les contraintes de nos polymères, nous avons fait le choix de développer **une dépolymérisation par hydrolyse acide supportée** avec l'utilisation d'une **résine cationique**.

I. Dépolymérisation par hydrolyse acide supportée d'EPS de microalgues

Afin de développer cette méthode d'hydrolyse supportée, il a été nécessaire de définir la nature de la résine cationique et le temps de réaction. La température a été fixée à 80 °C par analogie avec les données dans la littérature (Adrien et al., 2017).

I. 1. Choix de la résine cationique

Pour rappel, une résine est un polymère synthétisé sous forme de billes insolubles dans une solution aqueuse, contenant une structure macroréticulaire caractérisée par une aire de surface d'échange et une microporosité (Vilcoq et al., 2014). Cette étude a pour objectif de déterminer la résine cationique qui servira pour réaliser les dépolymérisations d'EPS issus de microalgues. Pour cela, 4 résines ont été testées, l'**Amberliste FPC23H**, l'**Amberlyst 15** et les **Dowex 50 WX8** et **88** à une concentration de 1,2 g/ml et dont les caractéristiques sont regroupées dans le tableau 6. Ces résines ont des capacités échangeuses de cation comprises entre **1,7 eq/l** et **4,7 eq/l**. Cette étude a été menée avec l'**EPS de *Porphyridium cruentum*** à une concentration de 5 mg/ml. Les dépolymérisations ont été effectuées dans un système batch pendant 5 h à 80 °C et les taux d'hydrolyse sont donnés en équivalent sucres réducteurs obtenus avec le dosage au DNS. En parallèle, une hydrolyse acide homogène avec une solution d'HCl 1 M est réalisée dans les mêmes conditions.

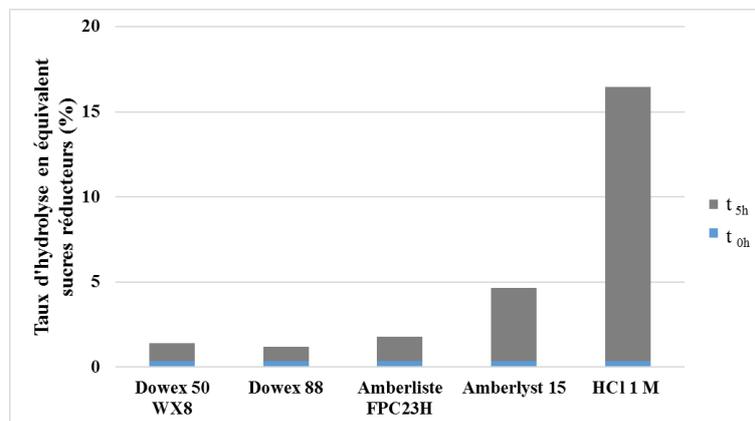


Figure 38 : Taux d'hydrolyse en équivalent sucres réducteurs (%) obtenu par le dosage au DNS après 5 h d'hydrolyse acide en milieu homogène ou hétérogène.

Initialement, le taux d'hydrolyse est de **0,37 %** et le pH des solutions en présence des différentes résines est de 2. Pour l'hydrolyse réalisée avec une solution d'HCl 1 M, le témoin positif de cette étude, le pH initial est de 0. Après 5 h de réaction, le taux d'hydrolyse atteint **16 %** avec la solution d'**HCl 1 M**. Pour les résines **Dowex 55 WX8** et **88** dont les capacités échangeuses d'ions sont respectivement de **1,7** et **1,8 eq/l**, le taux d'hydrolyse augmente de **0,6**

%. En ce qui concerne la résine **Amberliste FPC23H** ayant une capacité d'échange de **2,2 eq/l**, le taux d'hydrolyse atteint est de **1,5 %**. Ces 3 résines ne permettent donc pas de cliver efficacement cet EPS. En revanche, la résine **Amberlyst 15**, dont la force protonique est de **4,7 eq/l**, augmente de **4 %** le taux d'hydrolyse. Il est à noter que les pH restent aux alentours de 2 en présence des résines et de 0 avec la solution d'HCl 1 M.

Les **résines Dowex** ne sont pas connues dans la littérature pour dépolymériser des polysaccharides mais plutôt pour éliminer des interférents comme le 5-hydroxyméthylfurfural ou l'acide acétique au sein d'échantillons ayant subis une hydrolyse acide homogène (Lee et al., 2017). La dowex 50WX88 a servi pour dessaler et diminuer la présence d'ions métalliques dans des infusions de thé (Pekal and Pyrzynska, 2015). **Le résultat obtenu sur l'EPS de *Porphyridium cruentum* est donc en accord avec la littérature.**

La résine **Amberliste FPC23H** a servi à dépolymériser des ulvanes dont le poids moléculaire initial était estimé à 57 kDa. Après 24 h d'hydrolyse à 80 °C, le poids moléculaire atteint était de 4 kDa (Adrien et al., 2017). Dans notre étude, au regard des taux de sucres réducteurs, cette résine ne semble pas dépolymériser aussi efficacement notre EPS modèle dont le poids moléculaire moyen connu est compris entre 2×10^3 et 7×10^3 kDa (Geresh et al., 2002; Heaney-Kieras and J. Chapman, 1976). **Le poids initial de notre EPS étant beaucoup plus important que celui des ulvanes peut expliquer sa résistance.**

Des études menées par Rinaldi & al ont mis en évidence l'utilisation de la résine Amberlyst 15 pour hydrolyser la cellulose dissoute dans du 1-butyl-3-méthylimidazolium chloride. La température de réaction a été fixée à 100 °C. Après 5 h d'hydrolyse, 12,5 % de sucres réducteurs ont été produits et estimés par le dosage au DNS (Rinaldi et al., 2008, 2010). Le poids moléculaire de la cellulose est variable suivant les organismes mais cette masse est au minimum de 57 kDa (Gralén and Svedberg, 1943).

Conclusion

La résine **Amberlyst 15** ayant une capacité d'échange de proton de **4,7 eq/l** a été la seule résine de cette étude à initier la dépolymérisation de l'EPS de *Porphyridium cruentum* en augmentant le taux d'hydrolyse de **4 %** après 5 h de réaction. Dans la suite de ce projet, c'est donc cette résine qui sera utilisée pour dépolymériser les EPS de microalgues.

I. 2. Développement d'une méthode de suivi des dépolymérisations par SEC-HPLC

L'objectif de la dépolymérisation des EPS est de générer des polymères dont le poids moléculaire est en dessous de 50 kDa pour potentiellement accroître leurs effets biologiques. Le dosage au DNS est une méthode qui permet de mesurer le taux d'hydrolyse mais ne donne aucune information sur la taille des fragments formés. Il a donc été nécessaire de développer une façon de suivre la masse moléculaire au cours des hydrolyses supportées. Pour cela, nous avons fait le choix de nous servir de la chromatographie liquide gel perméation couplée à une détection par réfractométrie (RID). La méthode gel perméation séparant les polymères en fonction de leur taille nous permettra de visualiser la formation de polymères de bas poids moléculaires mais aussi de visualiser une diminution de la taille des polysaccharides de haut poids moléculaire.

Différents systèmes de séparation ont été testés : des colonnes G3000SW et G2000SW en série ; l'ajout d'une colonne superSW2000 au précédent montage et des colonnes G5000PW et G4000PW. Une gamme de pullulane dont les masses moléculaires moyennes sont comprises entre 0,3 et 806 kDa a été séparée avec les différents assemblages et les profils chromatographiques sont représentés dans la figure 39.

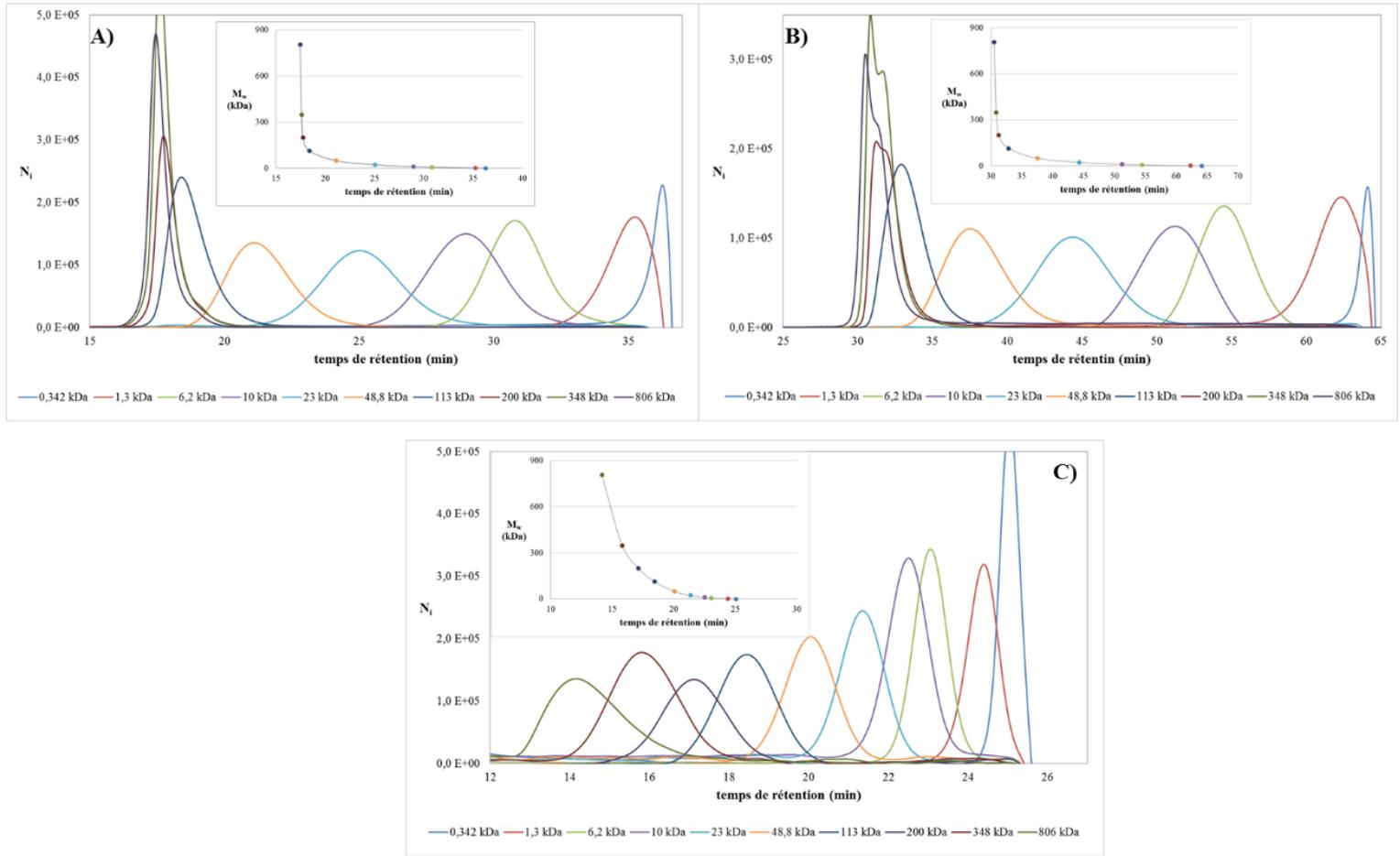


Figure 39 : Profils chromatographiques obtenus avec la méthode SEC-HPLC.

Les séparations des standards de pullulanes sont obtenues avec les systèmes de colonnes G3000SW-G2000SW (A) ; SuperSW2000-G2000SW-G3000SW (B) et G5000PW-G4000PW (C). En parallèle, les séparations sont représentées par les graphes montrant le poids moléculaire moyen en fonction du temps de rétention.

Les systèmes de séparation formés par les **colonnes SW** (figure 39A et 39B) permettent de distinguer les standards de pullulanes dont les **masses sont inférieures à 50 kDa**. Au-delà, les polymères ne sont plus dissociés et restent dans le volume mort. Le troisième montage formé par les **G5000PW-G4000PW** (figure 39C), comme attendu, sépare les **polymères de haut poids supérieurs à 113 kDa** mais également les **molécules de bas poids moléculaire** permettant ainsi de distinguer la large gamme de poids comprise entre 0,3 et 806 kDa. Ce dernier système a déjà été utilisé pour suivre la dépolymérisation de polysaccharide. C'est le cas de Sun & al (2009) et Adrien & al (2017) qui ont respectivement suivi le clivage de l'EPS de *Porphyridium cruentum* et d'ulvane.

Conclusion

Le système qui a permis de visualiser une large gamme de poids moléculaire comprise entre 0,3 et 806 kDa est composé des colonnes **G5000PW et G4000PW montées en série**. Ce montage sera donc utilisé pour suivre les différentes dépolymérisations de ce projet et sera nommé **SEC-RID** dans la suite de ce mémoire.

I. 3. Dépolymérisation de l'EPS issu de *Porphyridium cruentum* par hydrolyse acide supportée dans un système batch

Après avoir choisi la résine et la méthode de suivi, il est nécessaire de déterminer le temps de réaction pour produire des fragments de bas poids moléculaire inférieur à 50 kDa. Pour cela, une hydrolyse acide supportée à l'aide de la résine Amberlyst 15 à 40 mg/ml dans un système batch a été menée avec l'EPS natif de *Porphyridium cruentum* à une concentration de 2 mg/ml pendant 72 h à 80 °C sous agitation orbitale.

- Hydrolyse acide supportée de l'EPS natif de *Porphyridium cruentum*.

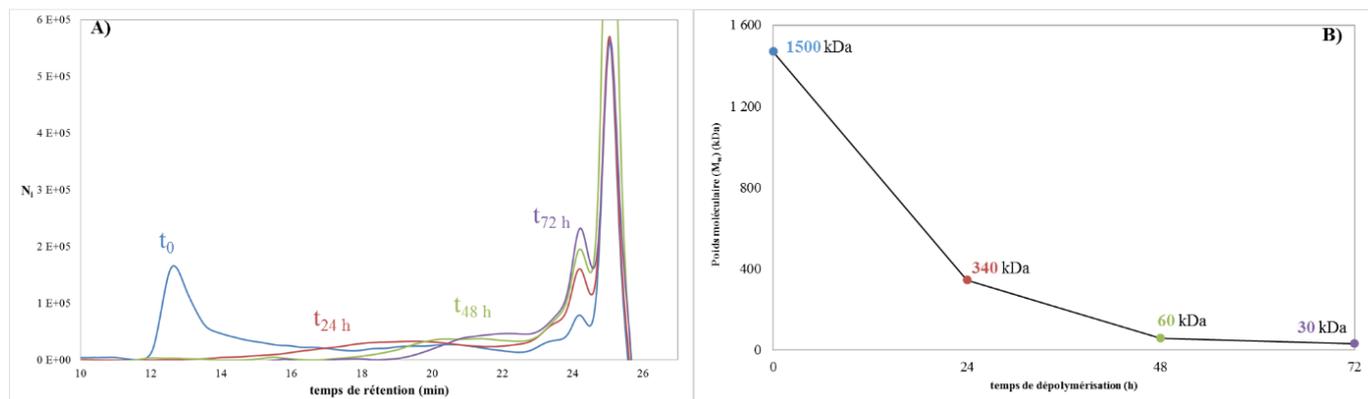


Figure 40 : Suivi de la dépolymérisation en batch de l'EPS de *Porphyridium cruentum* natif par SEC-RID (A) et évolution du poids moléculaire moyen (M_w) durant l'hydrolyse en batch (B).

La figure 40A montre le suivi de la dépolymérisation par SEC-RID. En parallèle, la figure 40B représente l'évolution du poids moléculaire moyen durant l'hydrolyse. Le poids moléculaire moyen (M_w) de cet EPS est estimé à **1500 kDa**. Cette masse est du même ordre de grandeur que dans l'étude menée par Sun & al (2009) qui ont estimé le poids de leur EPS de *Porphyridium cruentum* à 2900 kDa. En regardant le profil chromatographique, la forme native représentée par le t_0 montre la présence de plusieurs pics traduisant deux populations de polymères de masses différentes. Le premier pic dont le temps de rétention débute à 12 min rassemble les polymères de haut poids moléculaire. Sa forme polydisperse traduit une forte hétérogénéité de masse. Les molécules sortant à partir de 22 min sont, quant à elles, de taille moins importante que les précédentes. **Après 24 h** de réaction, le poids moléculaire est estimé

à **340 kDa** soit une diminution de 80 % de la masse initiale. **Après 48 h et 72 h**, les masses moyennes atteintes sont respectivement de **60 et 30 kDa**. Ces masses encore importantes sont dues à la présence de polymères de haut poids qui accroît la moyenne des masses.

D'après cette étude, 72 h d'hydrolyse dans un système batch sont nécessaire pour atteindre une masse inférieure à 50 kDa. Cette durée augmentera donc le coût de production qui peut être un inconvénient pour un transfert à échelle industrielle. Nous avons donc cherché à augmenter l'efficacité de cette méthode afin de réduire la masse moyenne finale et de diminuer le temps de dépolymérisation en réalisant un **prétraitement par haute pression** de l'EPS issu de *Porphyridium cruentum*. Cette étape a pour avantage d'améliorer la solubilité aqueuse de l'EPS. En termes de temps, elle ne dure que quelques heures ce qui ne devrait pas impacter le temps de ce procédé.

- Hydrolyse acide supportée de l'EPS prétraité par haute pression (PHTP) de *Porphyridium cruentum*

Après avoir subi le prétraitement par haute pression, l'EPS de *Porphyridium cruentum* à une concentration de 2 mg/ml, a été dépolymérisé par la résine Amberlyst 15 à une concentration de 40 mg/ml dans un système batch pendant 72 h à 80 °C sous agitation orbitale. Cette réaction a été suivie par une analyse SEC-RID (figure 41). Après le prétraitement par haute pression, la masse moyenne de l'EPS est de **700 kDa** correspondant à une réduction de la masse initiale de **54 %**. Après **24 h, 48 h et 72 h**, les masses moyennes obtenues sont respectivement de **200 kDa, 53 kDa et 33 kDa**.

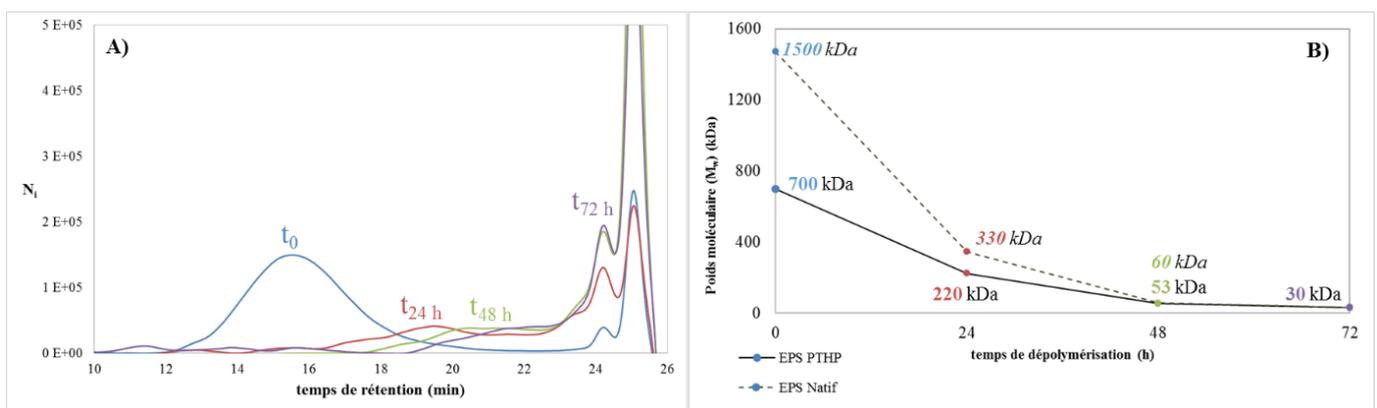


Figure 41 : Suivi de la dépolymérisation en batch de l'EPS PTHP de *Porphyridium cruentum* par SEC-RID (A). Evolution du poids moléculaire moyen (M_w) durant l'hydrolyse en batch à partir de l'EPS PTHP (trait plein) et de l'EPS Natif (trait pointillé) (B).

En comparant les dépolymérisations à partir des EPS natifs ou PTHP, nous remarquons que la diminution de la masse moyenne est plus importante dans les premières 24 h avec l'EPS

PTHP. En effet la masse atteinte est de **220 kDa** en partant de la forme **PTHP** contre **330 kDa** avec la forme **native**. En revanche, au bout de 48 h, les masses moyennes obtenues sont similaires (53 kDa et 60 kDa).

Conclusion

La masse moyenne de l'**EPS natif de *Porphyridium cruentum*** est estimée à **1500 kDa** par la méthode SEC-RID. Après **72 h** de dépolymérisation dans un système batch, la masse moyenne obtenue est de **30 kDa**, soit une diminution de 98 % de poids initial.

Le prétraitement par haute pression proposé pour réduire le temps de réaction permet d'atteindre une masse moyenne de 700 kDa. La réduction du poids moléculaire est **accélérée** dans les **premières 24 h de réaction**. Néanmoins, au bout de **48 h**, les masses moyennes obtenues sont **similaires** avec ou sans le prétraitement par haute pression.

Cette étude n'a donc pas permis de conclure sur la nécessité de réaliser un prétraitement par haute pression. Des hydrolyses acides supportées des 6 EPS sous forme native et prétraitée par haute pression devront donc être réalisées.

I. 4. Dépolymérisation des 6 EPS natifs et PTHP par hydrolyse acide supportée dans un système batch

Les hydrolyses acides supportées ont été réalisées sur les 6 EPS natifs et PTHP afin de conclure sur la nécessité de ce prétraitement et de déterminer le temps de dépolymérisation. Les masses initiales et celles obtenues après 24 h, 48 h et 72 h sont regroupés dans le tableau 9. Par comparaison, les résultats obtenus avec l'EPS de *Porphyridium cruentum* sont rappelés dans ce tableau. Les masses moyennes ont été estimées par la méthode SEC-RID. Les **EPS natifs** sont des polymères de haut poids moléculaire dont les masses sont comprises entre **1030 et 1550 kDa**. Tout comme pour l'EPS de *Porphyridium cruentum*, les poids moyens diminuent après le **prétraitement par haute pression** et sont compris entre **660 et 1260 kDa** correspondant à une diminution de **26 % à 44 %** de la taille initiale. Une exception demeure avec l'EPS de *Pavlova* sp. dont le poids moléculaire n'est pas réduit après le prétraitement.

Tableau 9: Poids moléculaire moyen (M_w) obtenus au cours des dépolymérisations des EPS natifs et PTHP.

EPS	<i>C. dentata</i>		<i>Pavlova</i> sp.		<i>Diacronema</i> sp.		<i>Glossomastix</i> sp.		<i>P. tricornutum</i>		<i>Synechococcus</i> sp.		<i>P. cruentum</i>	
	Natif	PTHP	Natif	PTHP	Natif	PTHP	Natif	PTHP	Natif	PTHP	Natif	PTHP	Natif	PTHP
Forme	M_w (kDa)		M_w (kDa)		M_w (kDa)		M_w (kDa)		M_w (kDa)		M_w (kDa)		M_w (kDa)	
Initial	1205	900	1030	1260	1030	660	1170	800	1400	890	1550	870	1500	700
24 h	1200	911	1240	1450	857	230	920	500	1200	860	66	65	344	222
48 h	1130	90	1160	900	99	50	115	66	226	47	66	65	60	53
72 h	77	73	550	700	22	30	11	12	40	42	67	65	30	33

L'hydrolyse acide supportée dans un système batch **réduit les M_w de tous les EPS au bout de 72 h** de réaction mais les effets sont différents selon la nature du polysaccharide. Après 24 h de dépolymérisation, aucune diminution de masse n'est mesurée avec les EPS natifs et PTHP issus de *Chrysotila dentata*, *Pavlova* sp. et *Phaeodactylum tricornutum*. En revanche, les EPS PTHP issus de *Diacronema* sp. et *Glossomastix* sp. s'hydrolysent plus facilement contrairement à la forme native. L'EPS issu de *Synechococcus* sp. s'hydrolyse rapidement car la masse moyenne obtenue après 24 h est d'environ 60 kDa avec ou sans PTHP et elle n'évolue pas après 48 h et 72 h de réaction. Au contraire, l'EPS issu de *Pavlova* sp. est résistant avec un poids 700 kDa après 72 h d'hydrolyse à partir de la forme PTHP.

L'intérêt du PTHP s'observe après **48 h de réaction**. Les masses obtenues sont comprises entre 47 kDa et 90 kDa pour les EPS PTHP issus de *Chrysotila dentata*, *Diacronema* sp., *Glossomastix* sp. et *Phaeodactylum tricornutum* alors que pour les formes natives les masses sont comprises entre 100 kDa et 1130 kDa. Après 72 h de réaction, les masses sont similaires entre les EPS natifs et PTHP.

Conclusion

La **dépolymérisation par hydrolyse acide supportée** permet de **réduire les masses moyennes de tous les EPS de ce projet**. Le prétraitement permet d'accélérer cette réduction et semble **nécessaire** pour hydrolyser l'EPS issu de *Pavlova* sp.. Le **PTHP sera donc la première étape de ce procédé de dépolymérisation**.

Concernant le choix du temps de l'hydrolyse acide supportée, au vu de ces résultats 2 choix s'offrent à nous. Tout d'abord, la première option est de prendre le temps permettant de générer des polymères proches de 50 kDa. Ceci aurait pour avantage de former des polymères de même poids moléculaire mais nécessiterait de prendre des temps différents selon les EPS. Un des inconvénients pour ce choix est notre méthode d'analyse. En effet, les estimations des masses sont réalisées par une détection RID uniquement avec une gamme de pullulane comme standard. Cette méthode nécessite que les composés à analyser et celui de la gamme étalon soient dans la même conformation afin d'associer les temps de rétention aux masses moléculaires (He et al., 2018). Or, nous ne disposons d'aucune information sur la conformation de nos polymères et les masses moléculaires calculées ne sont donc que des estimations. C'est l'analyse par triple détection associant les détections MALS/RID/VD, et ne nécessitant pas de gamme étalon, qui permettra de déterminer les poids moléculaires moyens (M_w) finaux. Il n'est donc pas judicieux de faire un choix en fonction d'approximation.

La seconde possibilité est de **prendre un temps commun** pour l'ensemble des EPS PTHP. **C'est cette alternative que nous avons choisie** car nous ne voulions pas baser notre choix sur des approximations de masses moyennes. Concernant le temps de réaction, deux éventualités sont possibles. Au regard des approximations de masses obtenues après 48 h et 72 h d'hydrolyse, elles sont du même ordre de grandeur pour 5 EPS du projet : *Porphyridium cruentum*, *Chrysotila dentata*, *Diacronema* sp., *Phaeodactylum tricornutum* et *Synechococcus* sp. En revanche pour *Glossomastix* sp., 72 h de réaction permet de générer des fragments de 10 kDa. Etant donné que nous souhaitons appliquer la même méthode pour les 6 EPS et que le temps soit industriellement possible, celui retenu est de **48 h**.

Conclusion

Le procédé de dépolymérisation débute par une étape de **prétraitement par haute pression** puis **une hydrolyse acide supportée** à l'aide de la résine **Amberlyst 15** dans un **système batch** est réalisée. Le choix est de prendre un temps applicable aux 6 EPS PTHP qui sera de **48 h**. Les EPS dépolymérisés par ce système batch seront notés **EPS-DPB** dans la suite de ce manuscrit.

Les systèmes batch sont efficaces mais les industriels ont tendance à développer des installations circulaires fermées afin de réduire les coûts de production. Nous souhaitons donc développer notre hydrolyse acide supportée dans un système circulaire fermé à lit fixe.

I. 5. Dépolymérisation d'EPS de microalgues par hydrolyse acide supportée dans un système circulaire fermé à lit fixe

Pour faciliter un transfert à une échelle industrielle, nous avons aussi développé cette méthode de dépolymérisation par hydrolyse acide supportée dans un système circulaire fermé à lit fixe. La température ainsi que la résine sont les mêmes que pour le système batch mais le temps de réaction reste à déterminer. Cette optimisation a été réalisée à l'aide de l'**EPS PTHP de *Porphyridium cruentum***. L'étude précédente a démontré la nécessité du prétraitement par haute pression. C'est donc pour cela que la dépolymérisation dans un système circulaire fermé se fera à partir des EPS PTHP.

- Etude à partir de l'EPS de *Porphyridium cruentum* PTHP pour déterminer le temps d'hydrolyse

Cette hydrolyse a été réalisée dans un système circulaire fermé maintenu à 80 °C. La solution d'EPS de *Porphyridium cruentum* PTHP à 2 mg/ml a circulé à un débit de 10 ml/min pendant 72 h et le lit fixe est formé par 10 g de résine Amberlyst 15. Le pH de la solution a été

de 2 durant toute l'hydrolyse acide supportée. Les figure 42A et 42B représentent les profils chromatographiques ainsi que le suivi du poids moléculaire moyen au cours de la dépolymérisation.

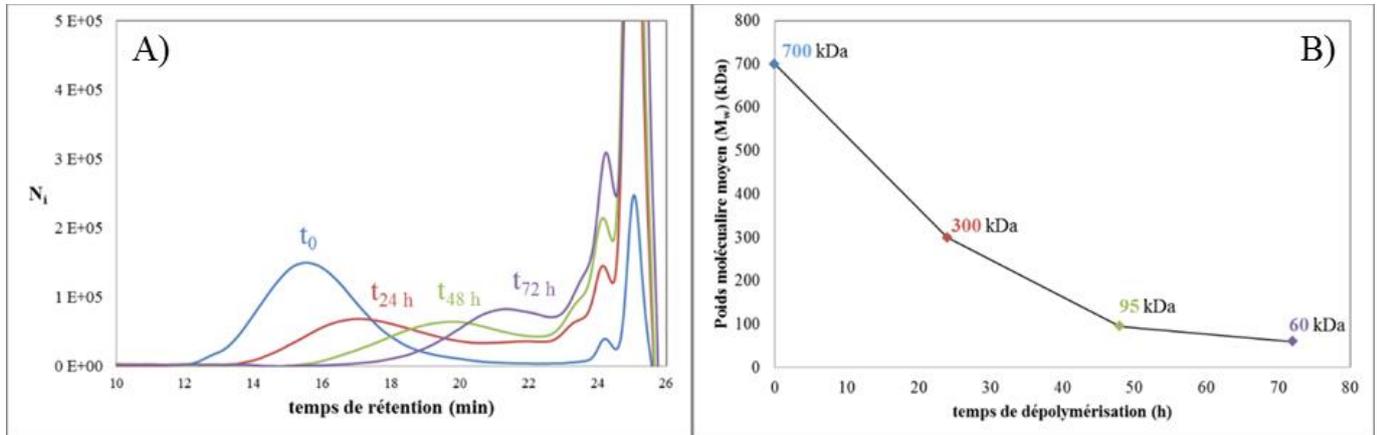


Figure 42 : Suivi de la dépolymérisation en continu de l'EPS PTHP de *Porphyridium cruentum* par SEC-RID (A) et évolution du poids moléculaire moyen (M_w) durant l'hydrolyse en continu (B).

Nous pouvons voir que l'hydrolyse acide supportée dans un système circulaire fermé fonctionne aussi. **Après 24 h**, le pic correspondant aux hauts poids moléculaires tend vers des temps de rétention plus élevés traduisant une diminution de la taille de l'EPS. De plus, la polydispersité de ce pic s'accroît reflétant une population hétérogène de ce polymère. Au niveau des oligomères, il y a apparition de sous-populations intermédiaires. Le poids moléculaire moyen est de **300 kDa** (contre 700 kDa après le PTHP). Au bout de **48 h**, la masse moyenne est de **95 kDa**. Avec une durée de **72 h**, le poids moléculaire moyen est de **60 kDa**. Ce poids encore élevé est dû à la présence de résidus de haut poids moléculaire mais, par analogie avec les standards de pullulane, les populations majoritaires ont une masse inférieure à 50 kDa.

Conclusion

La dépolymérisation dans un **système circulaire fermé** permet de dépolymériser l'EPS PTHP issu de *Porphyridium cruentum*. Le temps choisi est de **72 h** et permet d'obtenir une masse moyenne de **60 kDa**. Cette forme d'EPS sera notée **EPS-DPC**.

- Dépolymérisation dans un système circulaire fermé des 6 EPS de ce projet

Le temps de réaction de 72 h a été déterminé par l'étude sur l'EPS modèle. Le tableau 10 ci-dessous regroupe les suivis d'hydrolyse en système circulaire fermé des 6 EPS PTHP pendant 72 h de réaction.

Tableau 10 : Poids moléculaires moyens (M_w) obtenus après 24 h, 48 h et 72 h d'hydrolyse acide supportée à l'aide d'un montage circulaire fermé.

EPS PTHP	<i>C. dentata</i>	<i>Pavlova</i> sp.	<i>Diacronema</i> sp.	<i>Glossomastix</i> sp.	<i>P. tricornutum</i>	<i>Synechococcus</i> sp.	<i>P. cruentum</i>
t_0	900 kDa	1260 kDa	660 kDa	800 kDa	890 kDa	870 kDa	700 kDa
24 h	570 kDa	555 kDa	575 kDa	300 kDa	675 kDa	54 kDa	300 kDa
48 h	71 kDa	270 kDa	360 kDa	200 kDa	240 kDa	50 kDa	95 kDa
72 h	73 kDa	140 kDa	140 kDa	90 kDa	80 kDa	55 kDa	60 kDa

Nous pouvons voir que l'hydrolyse acide supportée **dans un système circulaire fermé réduit les poids moléculaires moyens des 6 EPS PTHP**. L'EPS issu de *Synechococcus* sp. se dépolymérise toujours aussi facilement car le poids de 50 kDa est atteint dès 24 h. La réduction de la masse s'effectue dans les premières heures 24 h de réaction pour les autres EPS sauf pour *Diacronema* sp. où peu de changements sont observés entre le t_0 et $t_{24\text{ h}}$ (660 kDa à t_0 et 575 à $t_{24\text{ h}}$). Après 48 h, les masses moyennes restent élevées et sont comprises entre 200 kDa et 420 kDa sauf pour *Chrysotila dentata* qui atteint 71 kDa. Au temps choisi pour la production, c'est-à-dire après **72 h**, les poids moyens sont encore élevés pour *Glossomastix* sp., *Pavlova* sp. et *Diacronema* sp. et sont compris entre **90 kDa et 250 kDa**. Pour ceux issus de *Phaeodactylum tricornutum*, *Chrysotila dentata* et *Synechococcus* sp. ils sont compris entre **55 kDa et 80 kDa**.

Conclusion

Le **système circulaire fermé** permet de dépolymériser les 6 EPS PTHP de ce projet après **72 h** de réaction. En comparant avec le système batch, il est nécessaire d'ajouter 24 h à ce procédé. Les masses moyennes restent élevées ce qui est probablement dû à la présence de résidus de haut poids moléculaire.

I. 6. Rendement de la méthode de dépolymérisation

Une fois les méthodes de dépolymérisation en système batch et circulaire fermé optimisées, les EPS DPB et DPC ont pu être produits pour réaliser les tests biologiques présentées dans la seconde partie des résultats et discussion. La quantité produite pour chaque EPS est de 50 mg et les rendements obtenus sont représentés sur la figure 43. Pour les systèmes **batch et circulaire fermé**, les productivités sont respectivement comprises entre **70 et 80 %** et **70 et 90 %**. Pour un même EPS, les rendements sont similaires quelque soit le système utilisé. Par exemple, pour l'EPS issu de *Synechococcus* sp. ils sont de 81 et 89 % respectivement pour les systèmes batch et circulaire fermé. Ces résultats sont en accord avec une étude sur le fucoïdane et le chondroïtine sulfaté fucosylé qui ont été dépolymérisés par un traitement hydrothermal pendant 20 à 90 min et où les rendements étaient d'environ 80 % (Shi et al.,

2019). Par contre, nos rendements sont supérieurs à ceux obtenus par une dépolymérisation enzymatique d'un chondroïtine où il était de 60 % après 48 h de réaction (de Souza et al., 2018).

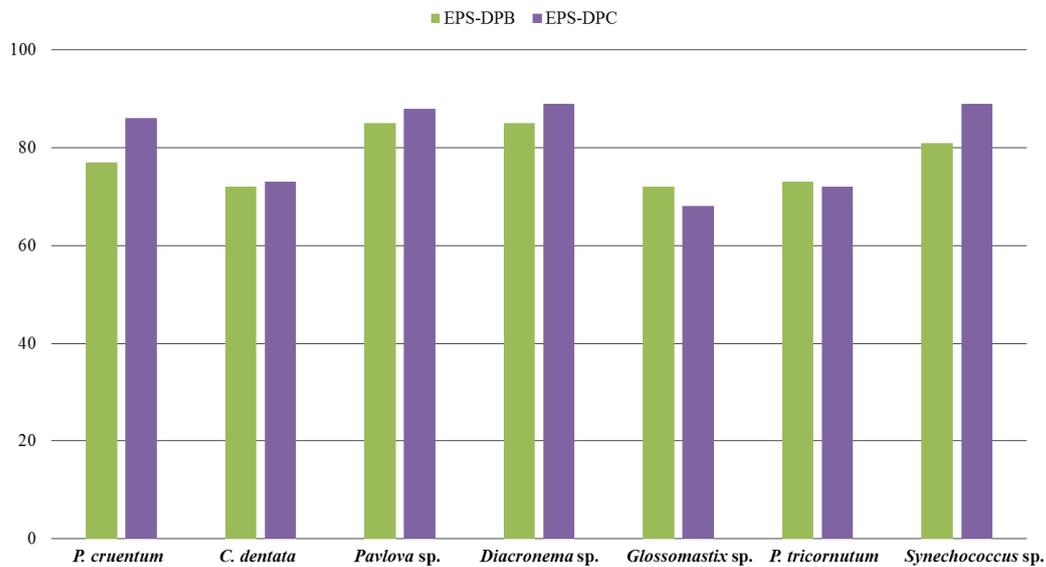


Figure 43 : Rendements de production des EPS DPB et DPC.

II. Caractérisations structurales des EPS

Les EPS natifs et dépolymérisés par la résine sont caractérisés d'un point de vue biochimique afin d'établir une relation structure-fonction avec les activités dermo-cosmétiques décrites dans la seconde partie de ces résultats et discussion. Pour cela, les taux de groupements sulfates, de protéines et d'acides uroniques ont été évalués. Une analyse de leur masse finale est aussi réalisée par triple détection MALS/RID/VD.

II. 1. Composition biochimique

Les EPS natifs et dépolymérisés dans les systèmes batch et circulaire fermé ont été caractérisés d'un point de vue biochimique par le dosage des groupements sulfates, des protéines et des acides uroniques. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Taux de groupements sulfates, de protéines et d'acide uronique des EPS natifs et dépolymérisés dans les systèmes batch et circulaire fermé.

<i>Souches</i>	Formes	Groupements Sulfates (%)	Protéines (%)	Acide uronique (%)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Initiale	10	9	7
	DPB	0,2	2	7
	DPC	0,3	4	6
<i>Chrysolila dentata</i>	Initiale	10	25	7
	DPB	0,2	8	6
	DPC	0,1	9	6
<i>Pavlova sp.</i>	Initiale	11	4	4
	DPB	1	3	5
	DPC	0,7	2	5
<i>Diacronema sp.</i>	Initiale	11	3	8
	DPB	1	3	4
	DPC	1	3	5
<i>Glossomastix sp.</i>	Initiale	14	4	26
	DPB	5	3	24
	DPC	5	2	24
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Initiale	14	18	4
	DPB	0,9	7	4
	DPC	0,7	5	5
<i>Synechococcus sp.</i>	Initiale	19	10	3
	DPB	0,3	2	3
	DPC	0,3	4	3

- Taux de groupements sulfates

Il est connu que les groupements sulfates jouent un rôle dans de nombreuses activités biologiques des polyaccharides sulfatés (Mestechkina and Shcherbukhin, 2010). Nous avons donc évalué les effets des hydrolyses acides supportées sur ces groupements par le dosage Azure A.

Initialement, les EPS contiennent entre **10 et 19 %** de groupements sulfates. Après les hydrolyses acides supportées **en batch** ou en **système circulaire fermé**, les taux chutent entre **0 et 1 %** sauf pour l'EPS issu de *Glossomastix sp.* qui conserve 4 % de groupements sulfates contre 13 % initialement. Aucune information sur la conformation de cet EPS n'est connue mais au vu de cette conservation, **il se pourrait que ces groupements soient protégés par la macrostructure de cet EPS.**

Dans la littérature, Adrien & al ont dépolymérisé des ulvanes à l'aide de la résine Amberliste FPC23H (2017) (deux fois moins acide que l'Amberlyst 15), en conservant 70 %

des groupements sulfates. Les dépolymérisations assistées par micro-ondes ou ultrasons de l'EPS de *Porphyridium cruentum* ont permis de conserver les groupements sulfates sur les EPS dépolymérisés (Sun et al., 2009, 2012b).

Conclusion

Les EPS **natifs** contiennent entre **10** et **19** % de groupements sulfates. Le taux chute entre **0** % et **1**% après les dépolymérisations **en batch** et avec le **système circulaire fermé**. L'acidité importante de la résine Amberlyst 15 n'a pas permis de conserver ces groupements mais a été nécessaire pour cliver nos EPS.

Notre dégradation impactant les groupements sulfates, réduit potentiellement les activités biologiques comme les propriétés anticoagulantes mais cet inconvénient pourrait être compensé par une sulfatation post-dégradation. Ceci augmenterait le coût de production de ces polymères nécessitant leur valorisation par des produits à haute valeur ajoutée comme des préparations pharmaceutiques.

- Taux de protéines

Les **EPS** de ce projet ne sont pas des polymères purs et contiennent entre 3 et 25 % **de protéines**. Dans notre contexte, elles sont des interférents car les activités recherchées doivent être préférentiellement exercées par la partie polysaccharidique. Les taux protéiques avant et après les hydrolyses acides supportées sont reportés dans le tableau 11.

Nous pouvons voir que pour les EPS dont le taux protéique **est inférieur à 4** %, comme par exemple pour l'EPS de *Pavlova* sp. les hydrolyses acide supportées **ne dégradent pas** les protéines. Pour les EPS où le taux protéique initial **est de 9** % comme celui issu de *Synechococcus* sp., la dépolymérisation **diminue** le contenu **en protéine entre 2** % et **3** %. Pour les EPS où les taux de protéines sont élevés c'est-à-dire issus de *Chrysothila dentata* avec **25** % et *Phaeodactylum tricornutum* avec **18** %, les hydrolyses acides diminuent les pourcentages pour atteindre entre **5** % et **9** % **de protéine**.

Pour rappel, les effets biologiques mis en évidence dans notre étude doivent préférentiellement être induits par la partie polysaccharidique des EPS. Dans la littérature, les équipes ayant des objectifs similaires purifient les polysaccharides en éliminant les protéines par des étapes de précipitations à l'aide par exemple de l'acide trichloroacétique (Leroy and De Vuyst, 2016; Oliveira et al., 1999) ou par l'action de protéases (Górska-Frączek et al., 2013)

Ainsi, l'hydrolyse acide supportée développée permet de dégrader partiellement les protéines des EPS évitant une étape de purification supplémentaire dans le procédé.

Conclusion

Les EPS **natifs** contiennent entre **3** et **25 %** de protéines. De manière générale, le taux de protéines **diminue avec l'hydrolyse acide supportée** réalisée dans les deux systèmes développés.

- **Taux d'acides uroniques**

Les acides uroniques ont un rôle dans l'effet de polysaccharides sur des activités biologiques telles que des propriétés antioxydantes (He et al., 2016). La présence d'acides uroniques a donc été déterminée sur les EPS de ce projet.

Ces **EPS** contiennent initialement entre **4 et 9 % d'acides uroniques** sauf pour l'EPS produit par ***Glossomastix sp.*** où la teneur est la plus importante avec **26 %**. Dans les formes DPB et DPC, les acides uroniques **sont conservés** et les résultats sont en accord avec une étude ayant dépolymérisée l'EPS de *Porphyridium cruentum* par micro-onde (Sun et al., 2009). La méthode de dépolymérisation réduit donc la masse moléculaire sans altérer ces monosaccharides chargés.

Conclusion

Les **EPS natifs** contiennent entre **4** et **9 % d'acides uroniques**. L'exception est l'EPS issu de ***Glossomastix sp.*** avec **26 %**. Après les dépolymérisations, les acides uroniques sont **conservés**.

II. 2. Mesure des M_w et M_n par la triple détection SEC-MALS/RID/VD

Après avoir produit les EPS dépolymérisés en batch et en système circulaire fermé, les poids moléculaires moyens en masse (M_w) et en nombre (M_n) ont pu être mesurés par une analyse triple détection couplant les détecteurs MALS/RID/VD. Cette technique a besoin d'environ 10 mg qui n'ont pas pu être produits pendant les phases d'optimisation au vu des faibles masses dont nous disposions au départ. Les résultats sont présentés dans le tableau 12 ci-dessous.

Tableau 12 : Poids moléculaires moyens en masse (M_w) et en nombre (M_n) et indice de polydispersité (I) déterminés par la méthode SEC-MALS/RID/VD.

<i>Souches</i>	Formes	M_w (kDa)	M_n (kDa)	I
<i>Porphyridium cruentum</i>	Initiale	1800	1200	1,5
	DPB	19	6	3,2
	DPC	14	4	3,5
<i>Chrysotila dentata</i>	Initiale	9500	4300	2,2
	DPB	30	3	10
	DPC	15	2	7,5
<i>Pavlova sp.</i>	Initiale	5600	4000	1,4
	DPB	110	80	1,37
	DPC	100	60	1,67
<i>Diacronema sp.</i>	Initiale	6100	3000	2
	DPB	730	57	12,8
	DPC	1200	40	30
<i>Glossomastix sp.</i>	Initiale	Non séparé	Non séparé	-
	DPB	140	15	9,3
	DPC	290	17	17
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Initiale	5000	1500	3,3
	DPB	2500	240	10,4
	DPC	2000	140	14,3
<i>Synechococcus sp.</i>	Initiale	3500	3100	1,1
	DPB	74	13	5,7
	DPC	95	7	13,5

Les **EPS natifs** de ce projet sont des **polymères de très hauts poids moléculaire** dont les M_w sont compris entre **1800 kDa** pour l'EPS modèle et **9500 kDa** pour celui de *Chrysotila dentata*. Les M_n , qui reflètent le poids moyen majoritaire sont compris entre **1200 kDa** et **4300 kDa**. Seuls les M_w et M_n de l'EPS natif issu de *Glossomastix sp.* n'ont pas pu être déterminés avec cette méthode. Ceci est probablement dû à la présence d'agrégats qui fausse les résultats en les surestimant.

En ce qui concerne les masses des **EPS dépolymérisés**, cette triple détection confirme plusieurs résultats obtenus par SEC-RID. Elle corrobore l'**efficacité de la méthode** de dépolymérisation et **accentue l'hétérogénéité des M_w obtenus en fonction de la nature de l'EPS et du système d'hydrolyse utilisé**. Pour l'EPS modèle les M_w obtenus après les dépolymérisations sont, comme souhaité, en dessous de 50 kDa et les M_n sont compris entre 4 kDa et 6 kDa. Dans ce cas et pour les EPS dépolymérisés issus de *Pavlova sp.* et *Synechococcus sp.* le système de dépolymérisation n'a pas d'effet sur les masses obtenues. En revanche, le système batch est plus performant pour les EPS issus de *Diacronema sp.* et *Glossomastix sp.*

où les M_w sont respectivement de 730 kDa et 140 kDa en batch contre 1200 kDa et 290 kDa en circulaire fermé. Ce phénomène est inversé pour l'EPS excrété par *Chrysotila dentata* où le M_w est deux fois plus faible avec le système circulaire fermé (15 kDa en continu contre 30 kDa en batch).

Les M_n sont au contraire relativement **similaires** avec les **deux systèmes de dépolymérisation**. Par exemple, pour l'EPS de *Chrysotila dentata* où les M_w étaient différents, les M_n sont de 2 kDa et 3 kDa avec les systèmes batch et circulaire fermé. Les exceptions sont les EPS DPB et DPC issus de *Phaeodactylum tricorutum* où les M_n sont respectivement de 240 kDa et 140 kDa.

Ces données sont différentes de celles obtenus avec l'analyse SEC-RID (cf tableau 9 et 10). Au regard de ces nouveaux résultats, **les M_w ont été sous-estimés avec la précédente méthode** (environ 1500 kDa en moyenne) et **cela est probablement dû à la limite du modèle obtenu avec la calibration de pullulane**. Ces masses initiales très importantes appuient les difficultés rencontrées pour dépolymériser ces macropolymères. Au niveau des produits de dépolymérisation, seuls les résultats pour l'EPS issu de *Synechococcus* sp. sont similaires. **Cet EPS aurait donc peut-être une conformation proche de celle du pullulane** qui est un polysaccharide linéaire formé d'unités de maltotrioses liées en α -1,6 et où les 3 unités de glucose sont assemblées par des liaisons α -1,4 (Trinetta and Cutter, 2016).

Pour les autres EPS DPB et DPC les résultats varient avec les deux méthodes. La séparation par gel perméation requière que les polymères étalons aient la même conformation que les composés à analyser ce qui est un verrou dans notre cas. La triple détection n'ayant pas besoin de gamme étalon permet de pallier à cela et donne donc un résultat précis sur les masses obtenues et non un résultat en équivalent de l'étalon (He et al., 2018). La détection par la diffusion de la lumière statique multi-angles, qui comme son nom l'indique, est basée sur la mesure de l'intensité diffusée par un objet sous différents angles, permet de calculer le rayon de giration. Ceci donne la taille et la conformation des molécules mesurées. De plus, le couplage à un viscosimètre et au RID apporte des informations sur la viscosité interne du polymère. C'est pour toute ces raisons que la triple détection a été utilisée dans ce projet afin de caractériser précisément ces EPS.

Conclusion

Les résultats obtenus par **la triple détection** confirment **l'efficacité de la méthode de dépolymérisation** et les **différences en fonction de la nature de l'EPS et du système de dépolymérisation utilisé**. Les disparités de masses obtenues entre les deux méthodes d'analyse confirment que la SEC-RID ne donne que des estimations quand les étalons et les polymères d'intérêts ne sont pas dans les mêmes conformations.

Conclusion Partie 1 : Dépolymérisation d'EPS de microalgues par hydrolyse acide supportée

- La méthode de dépolymérisation se déroule en deux étapes, un prétraitement par haute pression puis une hydrolyse acide supportée à l'aide de la **résine Amberlyst 15**.
- Le prétraitement initie les réductions des masses des EPS, facilitant l'hydrolyse acide. Cette forme d'EPS noté **PTHP** permet d'avoir un intermédiaire de haut poids moléculaire pour les tests biologiques.
- L'hydrolyse acide supportée est réalisée avec des systèmes **batch** et **circulaire fermé à lit fixe** mais les temps de réactions sont différents, **48 h** en batch et **72 h** en circulaire fermé.
- Les deux systèmes de dépolymérisation ne semblent pas générer les mêmes fragments.
- Ce procédé **est applicable** aux EPS de cette étude, c'est-à-dire l'EPS modèle de *Porphyridium cruentum* et les 6 nouveaux EPS mis en évidence dans le cadre du projet ANR POLYSALGUE.
- D'un point de vue biochimique, **les groupements sulfates** ne sont **pas conservés** avec cette méthode, **les protéines** sont **partiellement hydrolysées** et les **acides uroniques** **sont conservés**.
- Les masses moyennes obtenues par SEC-RID donnent une première estimation ce qui a permis de suivre les hydrolyses.
- La triple détection a permis de dire que les **EPS initiaux étaient des polymères de très haut poids moléculaire** (de 1500 kDa à 9500 kDa) et de confirmer l'efficacité de la méthode de dépolymérisation.

⇒ Dans cette étude, nous avons élaboré à partir des formes initiales des 6 nouveaux EPS de microalgues et de l'EPS modèle de *Porphyridium cruentum* 3 formes dépolymérisées. Il s'agit des EPS prétraités par haute pression (PTHP), hydrolysés dans un système batch (DPB) ou dans un montage circulaire fermé (DPC). L'évaluation des activités dermo-cosmétiques de ces EPS sera présentée dans la prochaine partie.

Partie 2

*Evaluation de l'activité anti-
âge d'EPS de microalgues*

Introduction

La recherche d'actifs anti-âges cible le vieillissement cutané qui se caractérise par une diminution du contenu en macromolécule du derme comme le collagène, l'acide hyaluronique ou l'élastine. La conséquence principale est l'apparition de rides avec une perte d'élasticité de la peau et une réduction de l'hydratation cutanée (Passeron and Ortonne, 2003). Une des approches est de stimuler la synthèse de ces polymères par les fibroblastes du derme afin d'accroître leur concentration dans la matrice extracellulaire. La seconde est de réduire leur dégradation extracellulaire en inhibant des enzymes responsables de ce clivage (Boisnic and Branchet, 2005). Dans cette partie, nous avons fait le choix de travailler sur deux lignées de fibroblastes dermiques humains issus de **femmes de 20 ans (les cellules 1059)** et de **46 ans (les cellules 1090)**. Les intérêts de faire cette étude sur deux lignées cellulaires issues de femme d'âges différents sont qu'elles **ne représentent pas le même panel de consommateur** et qu'elles sont **métaboliquement différentes**. Une femme de 20 ans ne possède pas encore de rides mais sa quantité de collagène a déjà commencé à diminuer contrairement à une femme de 46 ans dont les rides s'accroissent. Métaboliquement, les cellules issues d'une peau jeune se renouvellent plus rapidement et produisent une quantité plus importante de collagène par rapport aux cellules d'une peau mature (Lago and Puzzi, 2019). Ces deux modèles permettent donc de regarder si les EPS de microalgues permettent **d'inhiber l'apparition de rides et/ou de les réduire**. Dans cette partie, nous avons regardé l'impact des EPS sur les **productions de collagène et d'acide hyaluronique** par ces deux modèles cellulaires. Avant de réaliser ces tests, il a été nécessaire d'évaluer les effets de nos polysaccharides sur les viabilités et mortalités cellulaires de nos deux modèles fibroblastiques. Nous avons étudié le **potentiel inhibiteur** des EPS sur deux enzymes clivant le collagène et l'acide hyaluronique qui sont respectivement une **métalloprotéase 1** et une **hyaluronidase de type I**. Pour terminer, nous avons réalisé une **analyse des transcrits** pour comprendre le mécanisme d'action de certains EPS sur la synthèse et la dégradation du collagène par les fibroblastes issus d'une femme de 20 ans.

Pour déterminer la concentration d'EPS pour cette partie, nous avons effectué une étude préliminaire mesurant la production de collagène par les deux lignées de fibroblastes dermiques humains avec l'EPS natif de *Porphyridium cruentum* à 10, 100 et 200 µg/ml. A la concentration de 10 µg/ml, l'effet de cet EPS n'était pas visible sur les deux modèles cellulaires et à 200 µg/ml, les productions de collagène étaient similaires à celle induites par 100 µg/ml d'EPS. Nous avons donc retenu comme concentration de travail pour cette partie **100 µg/ml**.

I. Effet des EPS sur la viabilité cellulaire de fibroblastes dermiques humains

Avant de tester nos **EPS**, à une concentration de **100 µg/ml**, sur les productions de collagène et d'acide hyaluronique il a été nécessaire d'évaluer leurs impacts sur la **viabilité cellulaire** des deux lignées cellulaires de fibroblastiques dermiques humaines.

I. 1. Effet d'EPS de microalgues sur la viabilité cellulaire des fibroblastes dermiques humains 1059 (20 ans) et 1090 (46 ans)

La viabilité cellulaire en présence des **EPS à une concentration de 100 µg/ml** après **48 h** d'exposition a été évaluée par le test MTT. Ce dosage a aussi été réalisé dans les mêmes conditions avec les témoins positifs. Pour la **production d'acide hyaluronique**, le témoin positif est le **TGF- β1** à une concentration de **0,01 µg/ml** (Tanimoto et al., 2004) et pour la **synthèse de collagène**, la référence est **l'acide hyaluronique** à une concentration de **1000 µg/ml** (Donejko et al., 2015). Les résultats sont synthétisés dans la figure 44 ci-dessous et l'étude statistique des résultats a été effectuée par un test-t de Student.

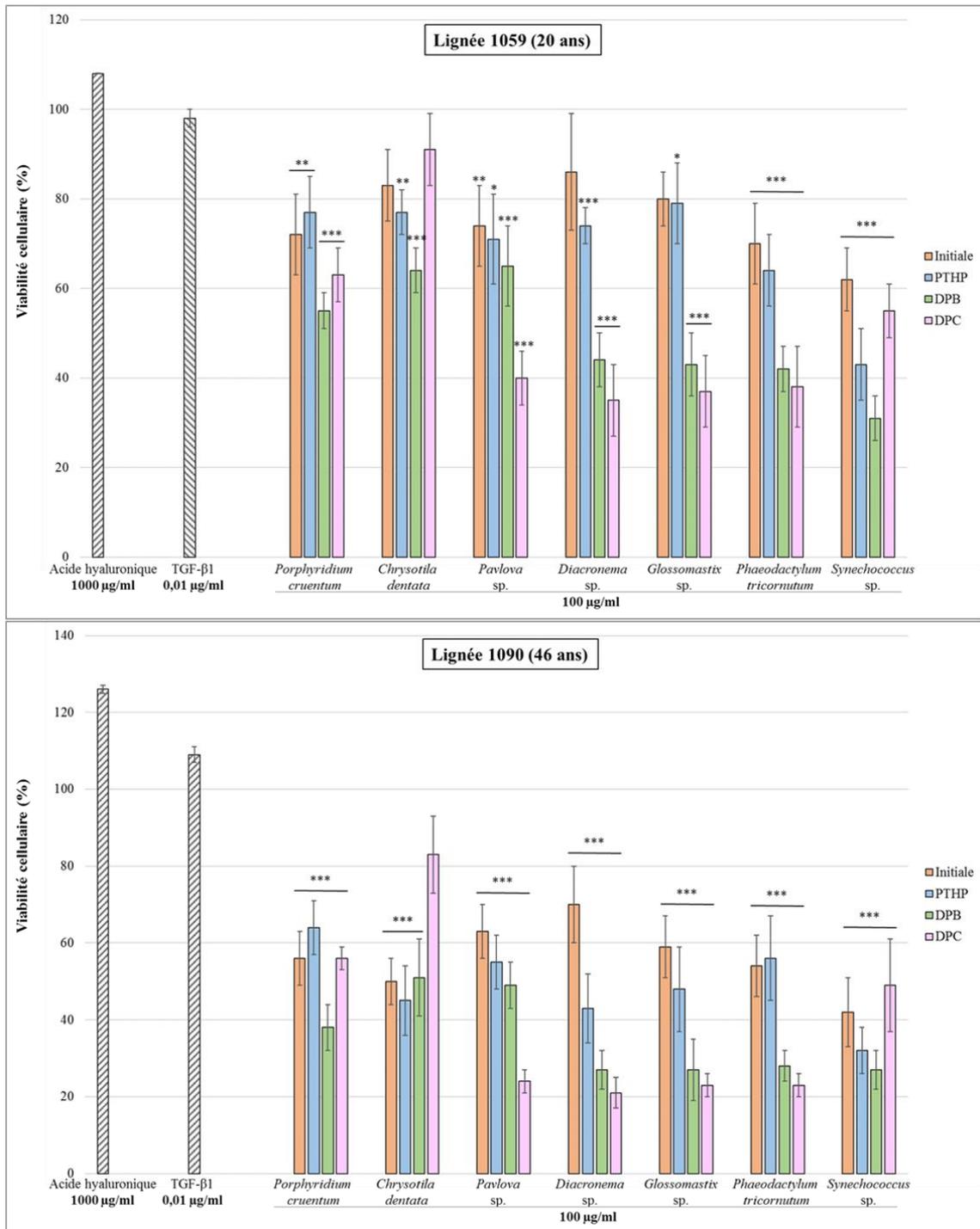


Figure 44 : Viabilité cellulaire (%) des fibroblastes dermiques humains 1059 (20 ans) et 1090 (46 ans).

Ces résultats sont obtenus avec le dosage MTT. Les cellules sont exposées pendant **48 h** aux différents **EPS (100 µg/ml)**, au **TGF- β1 (0,01 µg/ml)** et à l'**AH (1000 µg/ml)**. (n : 24 ; N : 3) test de significativité : *NS* : non significatif ; * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$.

Pour commencer, les cellules non exposées aux EPS correspondent aux 100 % de viabilité cellulaire. L'acide hyaluronique ainsi que le TGF-β1 n'ont pas d'effet sur la viabilité cellulaire des deux lignées cellulaires contrairement aux 4 formes des EPS qui la diminuent à une concentration de 100 µg/ml. Plus en détail, nous observons qu'elles sont comprises entre

62 % et 86 % pour la lignée 1059 et entre 42 % et 70 % pour la lignée 1090 suite à une exposition aux **EPS natifs**. Les résultats obtenus après un traitement par les **EPS PTHP** sont du même ordre de grandeur que ceux trouvés avec les EPS natifs. Les **EPS DPB** et **DPC** réduisent la viabilité cellulaire de manière plus importante que les précédents EPS avec des pourcentages de viabilité cellulaire compris entre 27 % et 65 % sur les 1059 et 21 % à 55 % pour les 1090. Une exception est l'EPS issu de *Chrysotila dentata* pour lequel l'EPS DPC n'a pas d'effet sur les fibroblastes dermiques humains. En comparant les deux lignées, les résultats suivent une même tendance mais l'impact des EPS est plus important sur la lignée 1090. Par exemple, l'EPS de *Glossomastix* sp. natif maintient une viabilité cellulaire de 80 % sur le modèle 1059 contre 59 % sur les cellules 1090.

D'un point de vue morphologique, après une exposition aux EPS DPB et DPC nous n'avons pas observé de changement morphologique des fibroblastes dermiques humains. Seul une modification de la forme cellulaire a été notée avec l'EPS natif issu de *Chrysotila dentata*.

Au vu de ces résultats, nous pouvons émettre différentes hypothèses. **La première est que cette viabilité cellulaire plus faible correspond à de la mortalité cellulaire.** Pour cela il est nécessaire de réaliser un dosage qui traduira une mortalité cellulaire comme celui de la lactate déshydrogénase qui mesure l'intégrité membranaire et dont les résultats seront présentés dans la partie I.2. Il s'agit d'une enzyme initialement présente dans le cytoplasme des cellules vivantes. Elle se retrouve dans le surnageant lorsque la membrane plasmique est endommagée (Kumar et al., 2018). C'est ce qui a été effectué dans une étude montrant les effets du chlorure de fer et du chlorure de nickel sur des fibroblastes sains et des cellules du cancer du foie. Leur test MTT avait mis en évidence une diminution de la viabilité cellulaire qui a été confirmée par une augmentation de LDH dans les surnageants de culture (Terpiłowska et al., 2018).

L'autre proposition est que cette diminution de viabilité cellulaire est causée par une réorientation du métabolisme vers la synthèse de macromolécules. Une étude a démontré que l'acide hyaluronique à une concentration de 100 µg/ml diminuait la viabilité cellulaire de 15 % de fibroblastes de fœtus après une exposition de 72 h et stimulait la production de collagène de 60 % (Mast et al., 1993). Il en est de même avec une expérimentation montrant que le TGF-β1 augmentait la synthèse de fibronectine accompagnée d'une diminution de la quantité d'ADN (Ignotz and Massagué, 1986). Plus récemment, une étude de transcript comparant différents gènes entre des fibroblastes d'un donneur de 10 ans et des cellules orientées vers une accélération de la prolifération a mis en évidence que le gène codant pour le collagène de type I était 7 fois moins exprimés chez les cellules qui sont en croissance (Lago

and Puzzi, 2019). Ceci appuie l'hypothèse que les cellules ne sembleraient pas être capables de proliférer et de synthétiser des macromolécules en même temps.

I. 2. Effet des EPS sur la mortalité des fibroblastes dermiques humains 1059 (20 ans) et 1090 (46 ans)

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle la réduction de la viabilité cellulaire serait médiée par une augmentation de la mort cellulaire par les EPS, nous avons procédé au dosage de l'activité de la LDH dans des surnageants cellulaires obtenus après une exposition par nos EPS à une concentration de 100 µg/ml pendant 48 h. Les témoins positifs et négatifs, le triton 1X et le milieu EMEM+AB, correspondent respectivement aux 100 % et 0 % de mortalité cellulaire. Les résultats obtenus pour les deux lignées cellulaires sont rassemblés dans la figure 45 ci-dessous.

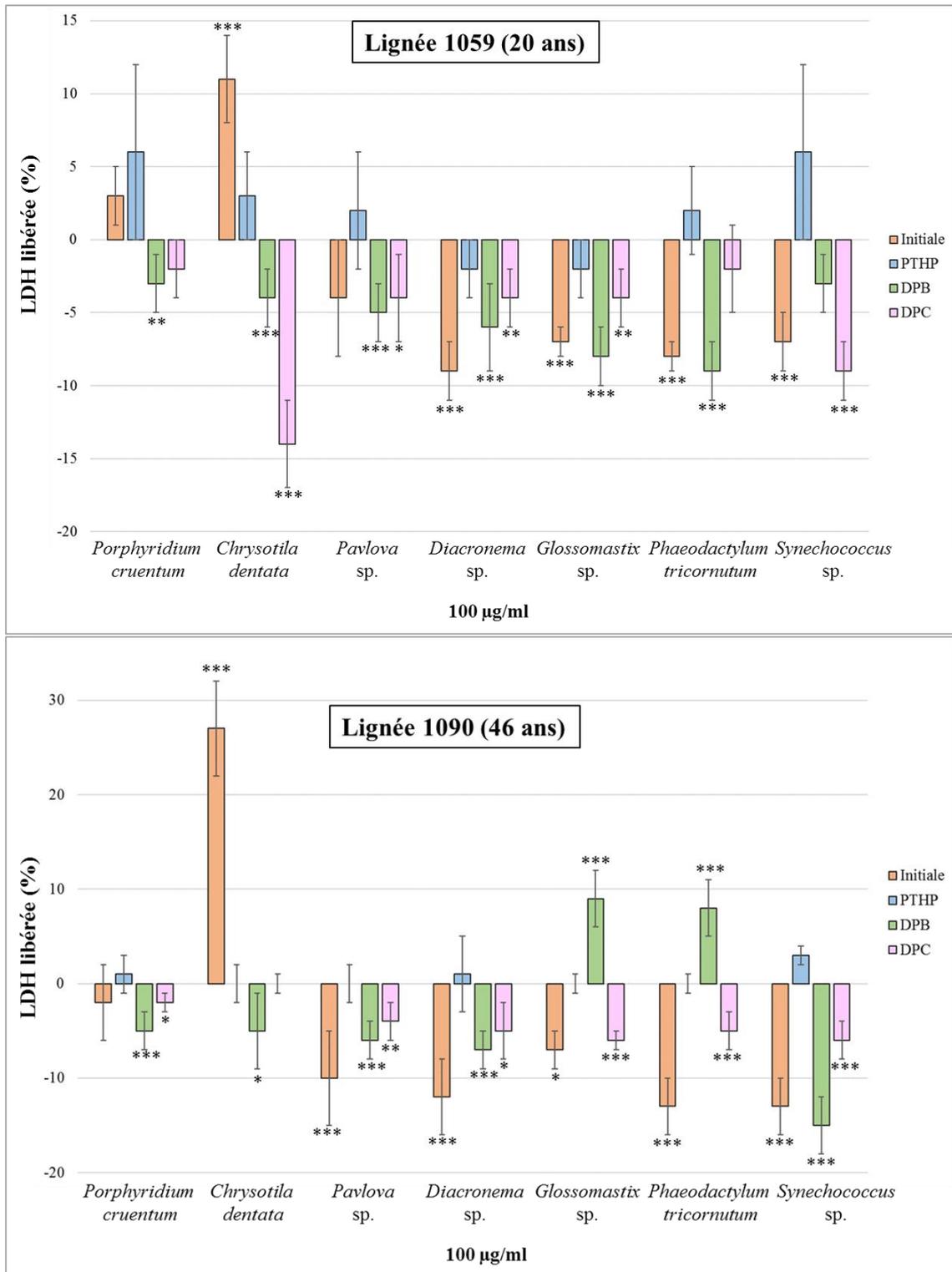


Figure 45 : Effets des EPS sur la libération de LDH (%) par les fibroblastes dermiques humains 1059 (20 ans) et 1090 (46 ans).

Ces résultats sont obtenus avec le dosage de l'activité de la **LDH** dans les **surnageants** de culture après une exposition des cellules pendant **48 h** aux différents **EPS (100 µg/ml)** et au triton **1X**. (n : 8) test de significativité : NS : non significatif ; * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$.

Nous pouvons voir que la majorité de nos EPS **n'induisent pas de mortalité cellulaire** à une concentration de 100 µg/ml. L'exception est la forme native de l'EPS issu de *Chrysothila dentata* où les pourcentages de LDH libérée sont de **11 %** sur les **1059** et de **27 %** sur les **1090** ont été mesurées. Ceci confirme le changement morphologique des cellules suite à leur contact avec cet EPS. Après le prétraitement par haute pression et avec les dépolymérisations, cet effet disparaît. Ainsi, **le potentiel anti-âge de la forme native de l'EPS issu de *Chrysothila dentata* ne serait pas évalué.**

Conclusion

Les **EPS diminuent les viabilités cellulaires** des deux modèles de fibroblastes dermiques humains. Cette réduction est plus marquée avec les EPS dépolymérisés. Au niveau de la morphologie, seul l'EPS natif de *Chrysothila dentata* induit un changement de la forme des cellules. **Deux hypothèses ont été émises** : la diminution de viabilité cellulaire mesurée correspond à de la **mortalité cellulaire** ou à une **réorientation des cellules** vers la **synthèse de macromolécules**.

Le dosage de la LDH a permis de démontrer que ces **EPS n'induisent pas de mortalité cellulaire**. La seule exception est l'**EPS natif de *Chrysothila dentata*** qui augmente la LDH libérée dans les surnageants confirmant le changement morphologique observé. L'hypothèse de l'induction de la mort cellulaire par nos EPS n'est donc pas vérifiée pour expliquer la diminution de viabilité cellulaire.

L'autre hypothèse émise pour expliquer la réduction de viabilité cellulaire est l'orientation des cellules vers la synthèse de macromolécules du derme. Pour la vérifier, nous avons évalué les productions de collagène et d'acide hyaluronique par les fibroblastes suite à leur traitement par nos EPS à la concentration de 100 µg/ml.

II. Stimulation des productions de collagène et d'acide hyaluronique par les fibroblastes dermiques humains

II. 1. Effets d'EPS de microalgues sur la production de collagène par les fibroblastes dermiques humains 1059 (20 ans) et 1090 (46 ans)

Les effets des EPS sur la synthèse de collagène intracellulaire ont été déterminés par un test *in vitro* utilisant une coloration au Sirius red. Les EPS testés à une concentration de **100 µg/ml** sont mis en contact avec les fibroblastes dermiques humains pendant 48 h. Pour rappel, une étude préliminaire avec l'EPS natif de *Porphyridium cruentum* a permis de fixer cette concentration de 100 µg/ml. Les productions de collagène exprimées en pourcentage, sont

ramenées au nombre de cellules. Nous avons normalisé le taux basal de collagène produit par les **cellules non exposées** aux différents polysaccharides à **0 %** dans les graphiques qui suivent. Le choix a été fait de présenter séparément les résultats obtenus pour chaque EPS puis de faire une discussion générale pour l'ensemble de ces données. L'AH a été choisi comme témoin positif, car c'est un polysaccharide faisant partie de la MEC du derme connu pour augmenter la production de collagène par les fibroblastes (Mast et al., 1993). De plus, c'est un actif polysaccharidique retrouvé dans de nombreuses formulations dermo-cosmétiques pour des actions anti-âges (Papakonstantinou et al., 2012). Sa concentration testée est de **1000 µg/ml** car aucun effet n'a été observé sur nos modèles à des concentrations plus faibles. Dans notre test, ce dernier augmente de **70 %** le contenu en collagène sur les deux lignées cellulaires de cette étude lorsqu'il est utilisé à **1000 µg/ml**.

II. 1. a. Résultats

II. 1. a. i. Effets des différents EPS issus de *Porphyridium cruentum* sur la production de collagène

La figure 46 illustre les effets des différents EPS issus de *Porphyridium cruentum*, polymère modèle de ce projet, sur les productions de collagène par des fibroblastes issus de femmes de 20 ans (1059) et 46 ans (1090).

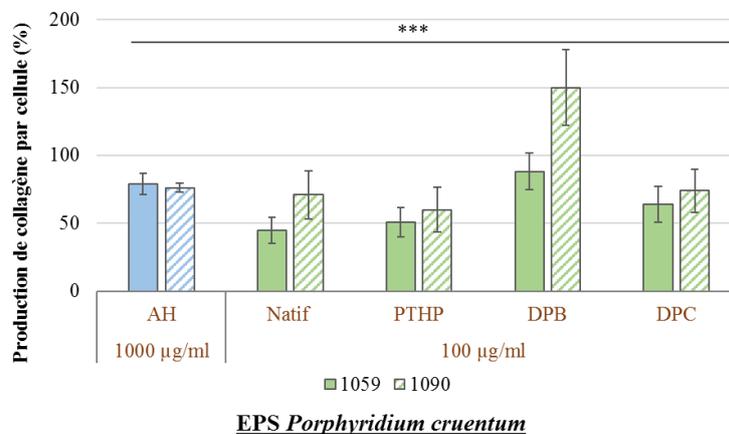


Figure 46 : Effets des différents EPS issus de *Porphyridium cruentum* sur la production de collagène par cellule (%).

Le collagène a été dosé par la coloration au Sirius Red après 48 h d'exposition des cellules aux EPS (100 µg/ml) ou à l'acide hyaluronique (1000 µg/ml). La production de collagène des cellules non exposées correspond à 0 %. ($n : 9 ; N : 3$). *** : $p \leq 0.001$.

Nous pouvons observer que **cet EPS stimule la production de collagène sur les deux lignées de fibroblastes dermiques humains**. Pour les EPS natifs, PTHP et DPC, les effets mesurés sont similaires à ceux obtenus avec l'acide hyaluronique (témoin positif), alors que

nos EPS sont 10 fois moins concentrés que la référence. Ces actions sont du même ordre de grandeur sur les deux modèles cellulaires. L'EPS **DPB** est le plus actif en stimulant de **70 %** la lignée 1059 et de **150 %** la lignée 1090.

II. 1. a. ii. Effets des différents EPS issus de *Chrysotila dentata* sur la production de collagène

La figure 47 montre les résultats obtenus après une exposition des fibroblastes à l'EPS de *Chrysotila dentata* sur la synthèse de collagène. Pour rappel, l'EPS natif n'a pas été testé car augmente la mortalité cellulaire. Seuls les résultats avec les EPS PTHP, DPB et DPC sont donc représentés sur ce graphe.

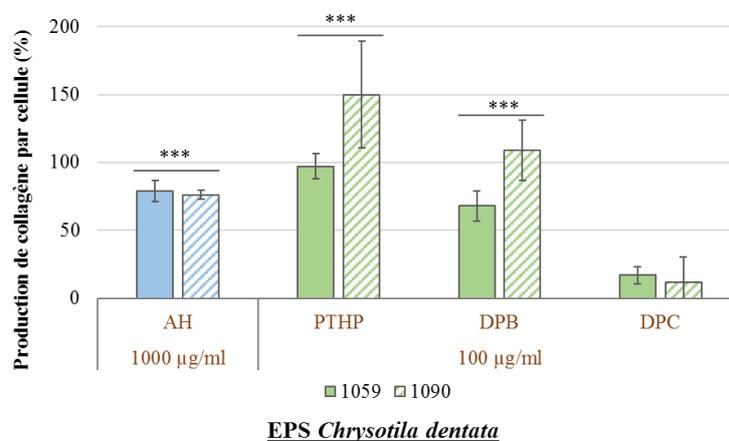


Figure 47 : Effets des différents EPS issus de *Chrysotila dentata* sur la production de collagène par cellule (%).

Le collagène a été dosé par la coloration au Sirius Red après 48 h d'exposition des cellules aux EPS (100 µg/ml) ou à l'acide hyaluronique (1000 µg/ml). La production de collagène des cellules non exposées correspond à 0 %. ($n : 9 ; N : 3$). *** : $p \leq 0.001$.

Nous observons que les **EPS PTHP et DPB issus de *Chrysotila dentata* accentuent les productions de collagène par les deux lignées cellulaires**. Seul l'EPS DPC n'a aucune activité. Les effets des EPS PTHP et DPB sont plus importants sur la lignée 1090 (46 ans). L'effet de la forme **PTHP** est de **100 %** sur les **1059** et de **150 %** sur les **1090**. Ces résultats sont similaires à l'AH pour la lignée 1059 et supérieurs sur les cellules 1090.

Au vu de ces premiers résultats, **les systèmes de dépolymérisation semblent donc générer des fragments différents pour cet EPS** qui n'exercent pas les mêmes activités biologiques sur nos modèles cellulaires.

II. 1. a. iii. Effets des différents EPS issus de *Pavlova sp.* sur la production de collagène

La figure 48 révèle les résultats obtenus avec les différents EPS issus de *Pavlova sp.*

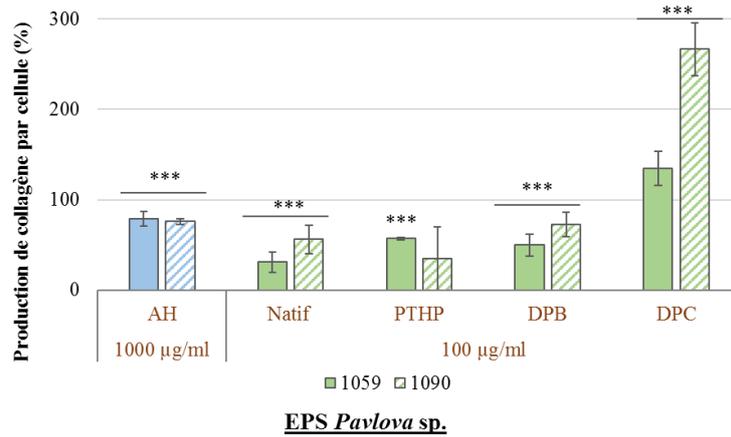


Figure 48 : Effets des différents EPS issus de *Pavlova* sp. sur la production de collagène par cellule (%).

Le collagène a été dosé par la coloration au Sirius Red après 48 h d'exposition des cellules aux EPS (100 µg/ml) ou à l'acide hyaluronique (1000 µg/ml). La production de collagène des cellules non exposées correspond à 0 %. ($n : 9 ; N : 3$). *** : $p \leq 0.001$.

Nous pouvons voir que les **EPS natifs, DPB et DPC** issus de *Pavlova* sp. **activent les productions de collagène sur les deux modèles cellulaires**. En revanche, l'EPS PTHP exerce un effet uniquement sur la lignée 1059. Pour les EPS natif et DPB, l'action est inférieure à celle exercée par l'AH uniquement pour la lignée 1059 car pour les cellules 1090 les résultats sont du même ordre de grandeur. Contrairement aux EPS issus de *Porphyridium cruentum*, c'est l'EPS **DPC** issus de *Pavlova* sp. qui est nettement le plus actif avec une stimulation de **130 %** et **260 %** sur les **1059** et **1090**. Tout comme l'EPS issu de *Chrysothila dentata*, **les produits de dépolymérisation semblent être différents** au vu de cette différence d'intensité de réponse cellulaire.

II. 1. a. iv. Effets des différents EPS issus de *Diacronema* sp. sur la production de collagène

La figure 49 présente les résultats après une exposition aux différents EPS issus de *Diacronema* sp.

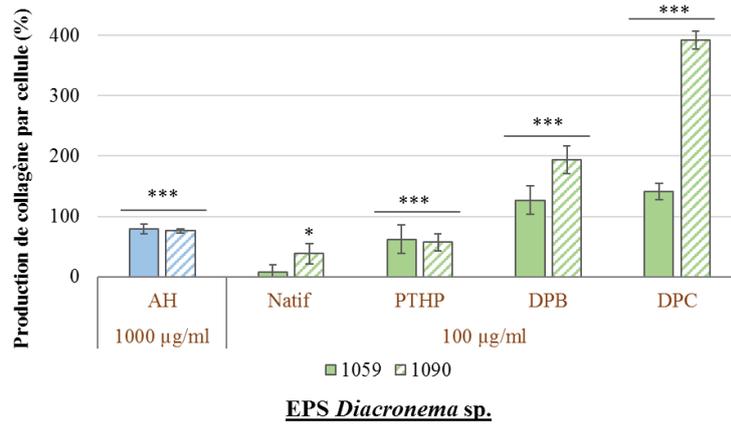


Figure 49 : Effets des différents EPS issus de *Diacronema sp.* sur la production de collagène par cellule (%).

Le collagène a été dosé par la coloration au Sirius Red après 48 h d'exposition des cellules aux EPS (100 µg/ml) ou à l'acide hyaluronique (1000 µg/ml). La production de collagène des cellules non exposées correspond à 0 %. ($n : 9 ; N : 3$). *** : $p \leq 0.001$.

La forme native de cet EPS n'a aucun effet sur la lignée 1059 à cette concentration de 100 µg/ml et exerce un faible effet sur la lignée 1090. Après le prétraitement, l'activité est proche de celle induite par l'acide hyaluronique et les réponses par les deux modèles cellulaires sont du même ordre de grandeur. Les formes DPB et DPC stimulent de façon plus importante la synthèse de collagène avec un impact plus marqué sur la lignée 1090. L'EPS **DPB** l'augmente de **120 %** et de **190 %** sur les cellules **1059** et **1090**. Cette hausse avec l'EPS **DPC** est la même qu'avec l'EPS DPB sur le modèle 1059. En revanche, tout comme pour l'EPS DPC issu de *Pavlova sp.*, l'EPS DPC de *Diacronema sp.* est plus actif sur le modèle **1090** en générant une augmentation de **390 %**.

II. 1. a. v. Effets des différents EPS issus de *Glossomastix sp.* sur la production de collagène

Les effets des EPS issus de *Glossomastix sp.* sont représentés dans la figure 50.

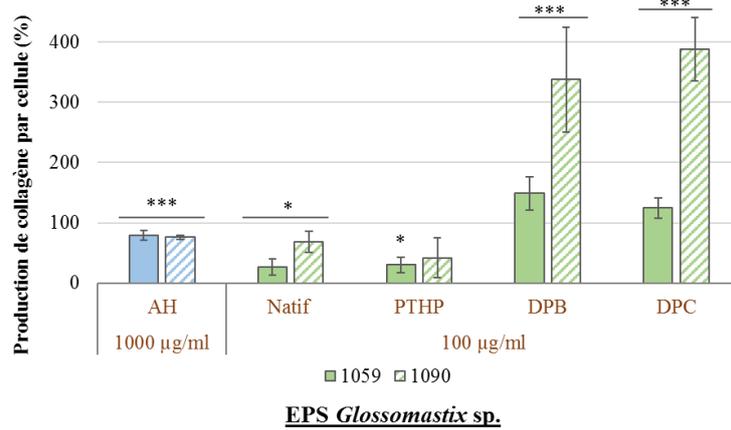


Figure 50 : Effets des différents EPS issus de *Glossomastix sp.* sur la production de collagène par cellule (%).

Le collagène a été dosé par la coloration au Sirius Red après 48 h d'exposition des cellules aux EPS (100 µg/ml) ou à l'acide hyaluronique (1000 µg/ml). La production de collagène des cellules non exposées correspond à 0 % ($n : 9 ; N : 3$). * : $p \leq 0.05$ *** : $p \leq 0.001$.

Les EPS natifs et PTHP stimulent faiblement les fibroblastes et ces résultats sont inférieurs à ceux produits avec l'AH. En revanche, **après les dépolymérisations supportées en batch et en système circulaire fermé, les productions de collagène sont augmentées entre 120 % et 150 % pour les cellules 1059 et de 300 % et 380 % pour les cellules 1090.** Comme pour les EPS issus de *Diacronema sp.*, le modèle 1090 est plus sensible à ces EPS dépolymérisés mais il n'y a pas de différence entre les systèmes d'hydrolyse.

II. 1. a. vi. Effets des différents EPS issus de *Phaeodactylum tricornutum* sur la production de collagène

La figure 51 montre les résultats obtenus avec l'EPS de *Phaeodactylum tricornutum*.

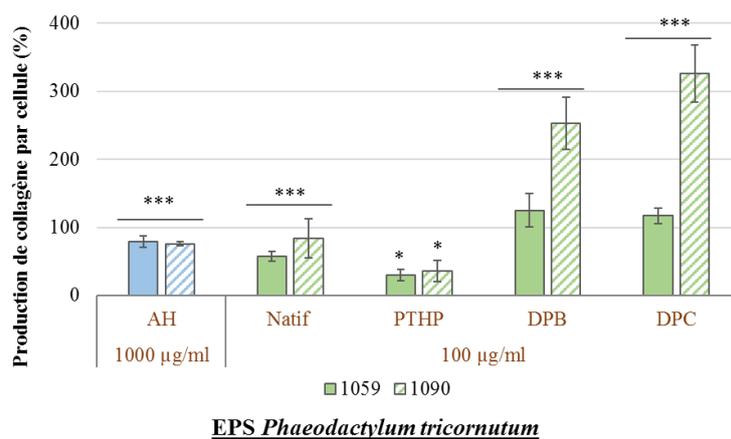


Figure 51 : Effets des différents EPS issus de *Phaeodactylum tricornutum* sur la production de collagène par cellule (%).

Le collagène a été dosé par la coloration au Sirius Red après 48 h d'exposition des cellules aux EPS (100 µg/ml) ou à l'acide hyaluronique (1000 µg/ml). La production de collagène des cellules non exposées correspond à 0 % ($n : 9 ; N : 3$). * : $p \leq 0.05$ *** : $p \leq 0.001$.

Les EPS DPB et DPC sont les plus actifs et la forme native induit des effets similaires à l'AH sur les deux modèles cellulaires. Comparativement aux autres formes, l'EPS PTHP a un faible impact. Les EPS dépolymérisés augmentent de 100 % la production de collagène par les fibroblastes 1059. C'est encore pour la lignée 1090 que l'augmentation est la plus importante avec + 253 % avec l'EPS DPB et + 326 % pour le DPC.

Ainsi, il y a une hétérogénéité entre les deux systèmes d'hydrolyse qui est uniquement mesurée sur la lignée 1090 où la forme DPC est nettement plus active. Il y a donc aussi une différence de réponse en fonction des modèles cellulaires.

*II. 1. a. vii. Effets des différents EPS issus de *Synechococcus* sp. sur la production de collagène*

Les résultats pour l'EPS de *Synechococcus* sp. sont illustrés dans la figure 52.

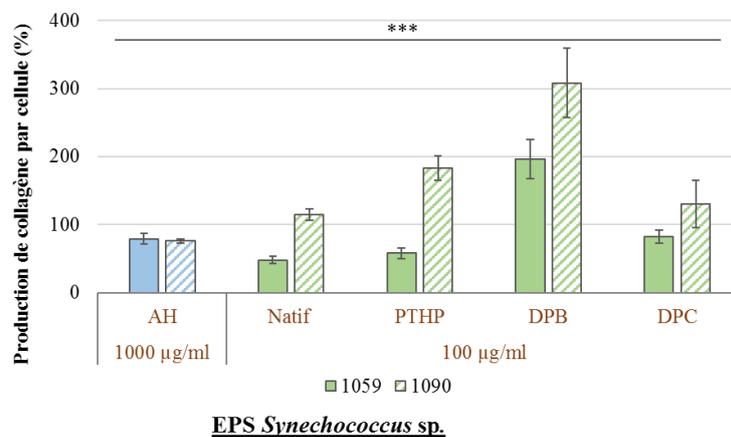


Figure 52 : Effets des différents EPS issus de *Synechococcus* sp. sur la production de collagène par cellule (%).

Le collagène a été dosé par la coloration au Sirius Red après 48 h d'exposition des cellules aux EPS (100 µg/ml) ou à l'acide hyaluronique (1000 µg/ml). La production de collagène des cellules non exposées correspond à 0 %. ($n : 9 ; N : 3$).*** : $p \leq 0.001$.

Tout comme pour l'EPS issu de *Porphyridium cruentum*, nous observons que tous les EPS issus de *Synechococcus* sp. augmentent la production de collagène par les deux lignées cellulaires. Les réponses sont plus marquées sur le modèle 1090, surtout avec l'EPS DPB où une hausse de 300 % est mesurée. Les EPS natifs, PTHP et DPC ont un effet supérieur à l'AH uniquement sur le modèle 1090. Concernant les résultats sur le modèle 1059, les EPS natif et PTHP ont moins d'effet que la référence à cette concentration de 100 µg/ml.

Pour cet EPS, c'est la forme DPB qui entraîne l'augmentation la plus importante avec une hausse de 200 % sur les 1059 et 300 % sur les 1090.

Conclusion

Les 7 EPS que nous étudions, stimulent la production de collagène par les deux modèles de fibroblastes dermiques humains. Les réponses cellulaires sont en général plus marquées avec le modèle issu d'une femme de 46 ans (1090) contrairement à celui issu d'une femme de 20 ans (1059). Les fragments générés par les deux systèmes de dépolymérisation (batch et circulaire fermé) exercent des effets différents. Généralement, les EPS dépolymérisés activent de manière plus importante la production de collagène. Ces résultats appuient l'hypothèse de l'orientation métabolique vers la synthèse de macromolécules du derme expliquant la réduction de la viabilité des cellules 1059 et 1090.

Les EPS où les augmentations sont les plus remarquables sont ceux issus de *Glossomastix sp.*, *Diacronema sp.*, *Synechococcus sp.* et *Porphyridium cruentum*.

De façon générale, ces 7 EPS ont une activité sur les deux modèles cellulaires issus de femme de 20 ans et de 46 ans et pourraient donc être proposés dans des formulations ciblant un panel de consommatrices dont le stade de vieillissement cutané est plus ou moins avancé.

Pour expliquer une activité biologique, il est intéressant de corrélérer les éléments structuraux disponibles avec les effets mesurés. Pour cela, une analyse en composante principale a été réalisée.

II. 1. b. Analyse en composante principale (ACP)

Nous avons souhaité mettre en relation les éléments structuraux dont nous disposons sur nos EPS avec les productions de collagène mesurées. Pour cela, nous avons réalisé une analyse en composante principale (ACP) où les individus sont les EPS natifs, DPB et DPC et où les variables sont les productions de collagène (%) et les viabilités cellulaires obtenues sur les lignées 1059, les contenus en groupements sulfates, protéines et acides uroniques, les M_w (kDa) et M_n (kDa) obtenus par triple détection et les pourcentages de M_w inférieurs à 10 kDa estimés par SEC-RID. Les représentations des variables et des individus sont illustrées dans la figure 53 .

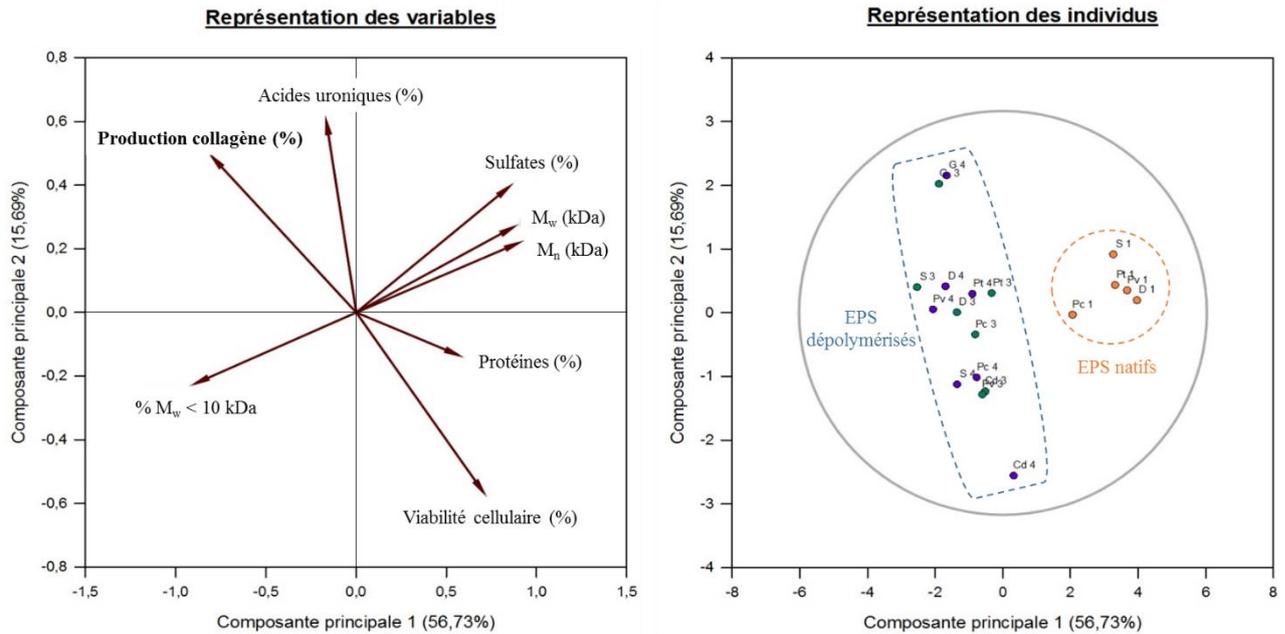


Figure 53 : Analyse en composante principale (Sigma plot) des productions de collagènes et des éléments structuraux des EPS.

Avec : 1 : EPS natif ; 2 : EPS DPB ; 3 : EPS DPC ; Pc : *Porphyridium cruentum* ; Cd : *Chrysolita dentata* ; Pv : *Pavlova* sp. ; G : *Glossomastix* sp. ; Pt : *Phaeodactylum tricornutum* ; S : *Synechococcus* sp.

Nous pouvons voir qu’avec les connaissances structurales actuelles de nos EPS, **la production de collagène semble être corrélée aux taux d’acides uroniques**. En revanche, le taux de groupements sulfates ainsi que le poids moléculaire moyen ne semblent pas être les facteurs structuraux influençant la production de collagène. Néanmoins, la représentation des individus montre deux groupes formés respectivement par les EPS natifs et les EPS dépolymérisés qui diffèrent principalement par leurs poids moléculaires et leurs taux de groupements sulfates. Pour rappel, les EPS dépolymérisés sont des polymères de bas poids moléculaire (généralement inférieur à 50 kDa) et dont le taux de groupement sulfate est proche de 0 alors les EPS natifs sont des polymères de haut poids moléculaire (supérieur à 1500 kDa) ayant des taux de groupements sulfates compris entre 9 % et 18 %.

II. 1. c. Discussion générale

Nous avons observé que ces 7 EPS ont la capacité de stimuler la production de collagène intracellulaire à une concentration de 100 µg/ml sans avoir d’effet cytotoxique. Dans la majorité des cas, les effets induits sont équivalents ou nettement supérieurs à l’impact de l’acide hyaluronique, qui dans notre étude a été testée à une concentration de 1000 µg/ml afin d’observer un effet.

Nous avons pu mettre en évidence plusieurs phénomènes :

- Des **réponses différentes en fonction du modèle cellulaire** avec un effet plus important sur le modèle 1090 issu d'une femme de 46 ans,
- Des **résultats hétérogènes en fonction de la masse moléculaire des EPS** avec une tendance pour des effets plus marqués avec les EPS DPB et DPC,
- Des **effets induits par les EPS dépolymérisés différents** en fonction du **système de dépolymérisation**.

Une des causes du vieillissement cutané est le déséquilibre entre la synthèse de collagène par les fibroblastes et sa dégradation par les métalloprotéases présentes dans la matrice extracellulaire. **La principale voie impliquée dans la production de collagène est celle du TGF- β 1 impliquant les protéines SMADs** (Schmierer and Hill, 2007). Elle a pour conséquence d'accroître l'expression des gènes de collagène de type I et III. L'acide hyaluronique a été démontré comme l'un de ces activateurs en augmentant les expressions des TGF- β 1, β -2 et β -3. A cela s'ajoute que l'AH augmente l'expression des TIMPs qui sont les inhibiteurs des MMP tendant donc vers l'inhibition de la dégradation du collagène (Wang et al., 2007). Au regard de la même nature biochimique de nos composés **nous pouvons émettre l'hypothèse que la production de collagène induite par nos EPS passerait par une activation de la voie de TGF- β 1 associé aux protéines SMADs**.

Cette cascade métabolique est principalement contrôlée par l'expression du récepteur TGF β -R2. Ce dernier est un des éléments clés car il est activé par la fixation du TGF- β 1 extracellulaire et provoque l'activation des protéines SMADs. Avec l'âge, il a été démontré que la quantité de ce récepteur diminuait (Shin et al., 2019). Une des causes est le changement morphologique des fibroblastes. Au sein d'une peau jeune, les fibroblastes sont, entre autres, ancrés aux fibres de collagènes bien organisées. Cette liaison fibroblastes-fibres de collagène entraîne une force de tension ayant pour conséquence de maintenir les fibroblastes dans une forme très allongée. Dans une peau mature, les fibres de collagène sont hydrolysées en fragments réduisant ainsi la force de tension appliquée sur les fibroblastes. Ceci conduit à un rétrécissement de la structure des fibroblastes entraînant une diminution du nombre de récepteur TGF β -R2, réduisant ainsi la production de collagène (Fisher et al., 2016). **En plus de stimuler la voie du TGF- β , ces 7 EPS pourraient donc rétablir une force de tension permettant**

d'accroître le nombre de récepteur TGF β -R2 ce qui accentuerait la production de collagène sur le modèle de 46 ans par rapport au modèle de 20 ans.

Pour certains de nos EPS comme ceux issus de *Diacronema* sp., *Glossomastix* sp. et *Phaeodactylum tricornutum*, l'activité est accrue avec une réduction de la taille de ces polymères. Il est connu que la diminution du poids moléculaire est un facteur accentuant les activités biologiques comme les propriétés antioxydantes (Sun et al., 2009). **Ainsi pour ces EPS, la diminution de la taille serait un des facteurs modulant l'activité biologique.**

Les systèmes circulaires fermés sont de plus en plus recherchés dans le domaine industriel car ils présentent de nombreux avantages. En effet, ils permettent de diminuer les coûts de production, sont automatisables et entraînent une faible empreinte environnementale contrairement aux systèmes discontinus (Yang et al., 2019a). Nous avons constaté dans nos résultats des effets différents selon le mode de production de nos EPS dépolymérisés. **Nous pouvons émettre l'hypothèse que les interactions EPS-résines sont différentes en fonction du système choisi.** Pour appuyer cela, Ardhan & al (2015) ont développés un électrocoagulateur afin d'éliminer des résidus de réactif bleu 21 des eaux usées. Comme dans notre cas, ils ont mis en place des systèmes batch et circulaire fermé. La comparaison de ces montages a permis de mettre en avant une performance supérieure avec une enceinte batch due à une meilleure distribution des espèces.

Ainsi, dans notre étude, les deux systèmes de dépolymérisation mis en place ont généré des **fragments de tailles hétérogènes agissant différemment sur la production de collagène.** L'acide hyaluronique est connu pour exercer des actions différentes en fonction de la taille des fragments. Par exemple, le phénotype des macrophages n'est pas le même quand ils ont été exposés à des AH de haut ou de bas poids moléculaire. Ceux traités par des AH de masses importantes seront impliqués dans la résolution de l'inflammation alors que ceux exposés aux bas poids moléculaires seront pro-inflammatoires (Rayahin et al., 2015).

Conclusion

Dans la littérature, la voie du TGF- β associé aux protéines SMADs est activée par l'AH. Avec l'âge, les forces de tension sont réduites ce qui entraîne un changement morphologique ayant des répercussions sur l'expression de récepteur diminuant la synthèse de collagène. **Nos EPS sembleraient activer la voie du TGF- β et/ou rétabliraient une force de tension pour accroître la production de collagène.**

Afin de confirmer ces hypothèses, il est intéressant de réaliser une analyse des transcrits et/ou des niveaux des protéines impliquées dans cette voie métabolique (cf paragraphe IV)

II. 2. Effets d’EPS de microalgues sur la production d’acide hyaluronique par les fibroblastes dermiques humains 1059 (20 ans) et 1090 (46 ans)

Comme pour les études précédentes, ces 7 EPS ont été testés à une concentration de **100 µg/ml**. Les effets des EPS sur la sécrétion d’AH ont été mesurés sur les surnageants cellulaires obtenus lors du dosage du collagène après **48 h** d’exposition. Les dosages de l’acide hyaluronique excrété ont été faits par un test ELISA. La production d’AH est exprimée en pourcentage par cellule. Celle induite par les **cellules non exposées aux EPS a été normalisé à un taux basal à 0 %** dans les graphiques qui suivent. Le témoin positif est le **TGF-β1**, qui à une concentration de **0,01 µg/ml** augmente de **40 %** et de **30 %** l’acide hyaluronique produit par les fibroblastes **1059** et **1090**. Tout comme la partie précédente, les résultats de chaque EPS seront présentés séparément suivis d’une discussion générale.

II. 2. a. Résultats

i. **Effets des différents EPS issus de *Porphyridium cruentum* sur la production d’AH**

La figure 54 ci-dessous représente les productions d’acide hyaluronique par les cellules 1059 et 1090 suite à une exposition aux différents EPS issus de *Porphyridium cruentum*.

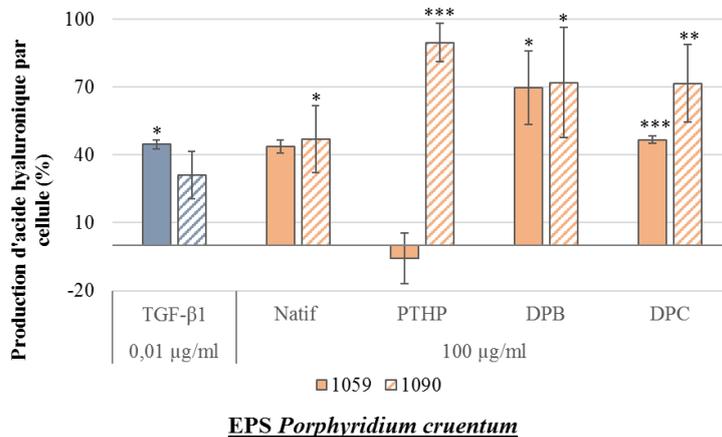


Figure 54 : Effets des différents EPS issus de *Porphyridium cruentum* sur la production d’AH extracellulaire par cellule (%).

Les cellules ont été exposées pendant 48 h aux EPS testés à une concentration de 100 µg/ml ou au TGF-β1 à 0,01 µg/ml. Le dosage a été réalisé sur les surnageants cellulaires à l’aide d’un test ELISA. (n : 3 ; N : 3). * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$.

Nous pouvons voir que les **EPS issus de *Porphyridium cruentum* activent la synthèse d’AH par la lignée 1090**. La forme native entraine un effet du même ordre de grandeur que le

TGF- β 1 avec une augmentation de **40 %**. Pour les EPS PTHP et DPB, la stimulation est plus importante que la référence avec un accroissement entre **70 %** pour les DPB et jusqu'à **90 %** pour l'EPS PTHP. En revanche, les résultats sur la lignée 1059 sont différents car l'EPS PTHP n'a aucun impact sur la production d'acide hyaluronique de cette lignée. En revanche, pour la forme native, la réponse de ces cellules est la même que la lignée 1090 c'est-à-dire un effet proche du TGF- β 1. L'EPS **DPB** entraîne une augmentation de **70 %** comme sur la lignée 1090 contrairement à l'EPS **DPC** où l'augmentation est de **40 %** sur cette lignée 1059 contre **70 %** sur les cellules 1090.

*II. 2. a. i. Effets des différents EPS issus de **Chrysotila dentata** sur la production d'AH*

Les résultats obtenus après une exposition aux EPS PTHP, DPB et DPC issus de *Chrysotila dentata* sont représentés dans la figure 55. Pour rappel, la forme native n'est pas testée au vu de son effet sur la mort cellulaire.

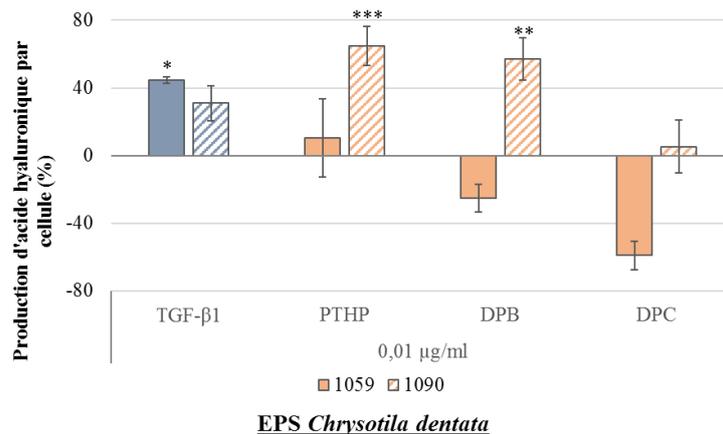


Figure 55 : Effets des différents EPS issus de *Chrysotila dentata* sur la production d'AH extracellulaire par cellule (%).

Les cellules ont été exposées pendant 48 h aux EPS testés à une concentration de 100 μ g/ml ou au TGF- β 1 à 0,01 μ g/ml. Le dosage a été réalisé sur les surnageants cellulaires à l'aide d'un test ELISA. (n : 3 ; N : 3). * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$.

Nous pouvons voir que, comme pour les EPS issus de *Porphyridium cruentum*, les deux lignées cellulaires ne répondent pas de la même manière face aux EPS de *Chrysotila dentata*. En effet, **aucune augmentation d'AH n'est mesurée sur la lignée 1059**. Pour la lignée 1090, les EPS PTHP et DPB accroissent respectivement de **65 %** et de **57 %** l'excrétion d'AH contrairement à l'EPS DPC qui n'a aucune activité.

II. 2. a. ii. Effets des différents EPS issus de *Pavlova sp.* sur la production d'AH

Les résultats recueillis avec les EPS de *Pavlova sp.* sont illustrés par la figure 56.

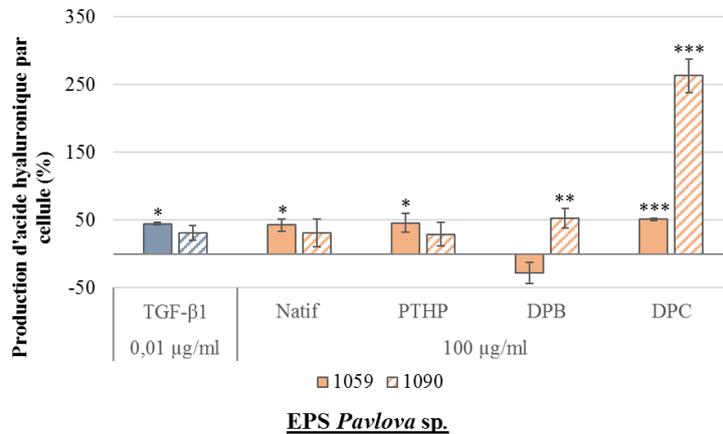


Figure 56 : Effets des différents EPS issus de *Pavlova sp.* sur la production d'AH extracellulaire par cellule (%).

Les cellules ont été exposées pendant 48 h aux EPS testés à une concentration de 100 μg/ml ou au TGF-β1 à 0,01 μg/ml. Le dosage a été réalisé sur les surnageants cellulaires à l'aide d'un test ELISA. (n : 3 ; N : 3). * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$.

Tout comme l'EPS issu de *Chrysothila dentata*, les cellules répondent différemment à cet EPS. Les EPS natifs et PTHP n'ont pas d'effet sur la lignée 1090 alors qu'ils augmentent de **50 %** la production d'AH par les cellules **1059**. Les EPS DP entraînent aussi des réactions différentes. La synthèse d'AH est augmentée de **50 %** par l'EPS **DPB** et de **250 %** avec l'EPS **DPC** par les cellules **1090**. Sur modèle 1059, l'EPS DPB n'a plus d'effet et l'EPS DPC augmente de **50 %** la synthèse d'AH.

II. 2. a. iii. Effets des différents EPS issus de *Diacronema sp.* sur la production d'AH

Les productions d'AH suite à une exposition aux EPS issus de *Diacronema sp.* sont rassemblées dans la figure 57 ci-dessous.

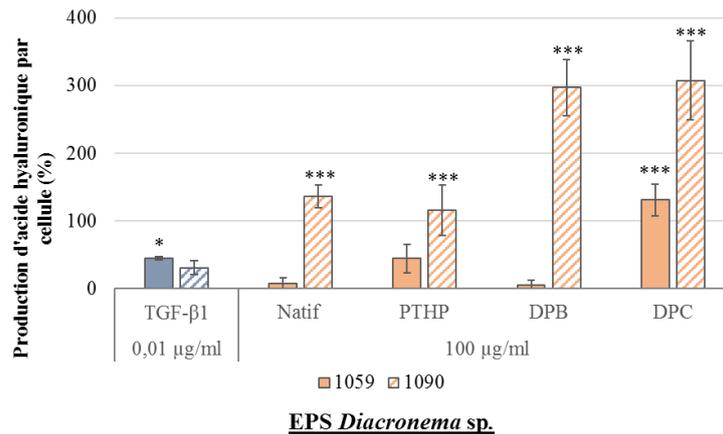


Figure 57 : Effets des différents EPS issus de *Diacronema sp.* sur la production d'AH extracellulaire par cellule (%).

Les cellules ont été exposées pendant 48 h aux EPS testés à une concentration de 100 μg/ml ou au TGF-β1 à 0,01 μg/ml. Le dosage a été réalisé sur les surnageants cellulaires à l'aide d'un test ELISA. (n : 3 ; N : 3). * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$.

Tout comme les EPS précédents, les lignées ne réagissent pas de la même manière après une exposition à cet EPS. En effet, sur la lignée **1059**, seule l'EPS **DPC** entraîne une production de **130 %** d'AH. Ce résultat est nettement supérieur au TGF- β1 (+ 40 %). En revanche, la synthèse d'AH est augmentée d'environ **100 %** avec les EPS natifs et PTHP et de **300 %** avec les EPS **DPB** et **DPC** par la lignée **1090**. Sur cette lignée, la réduction du poids moléculaire semble être un facteur important pour accroître la production d'AH.

II. 2. a. iv. Effets des différents EPS issus de *Glossomastix sp.* sur la production d'AH

Les résultats obtenus suite à une exposition aux EPS issus de *Glossomastix sp.* sont illustrés dans la figure 58.

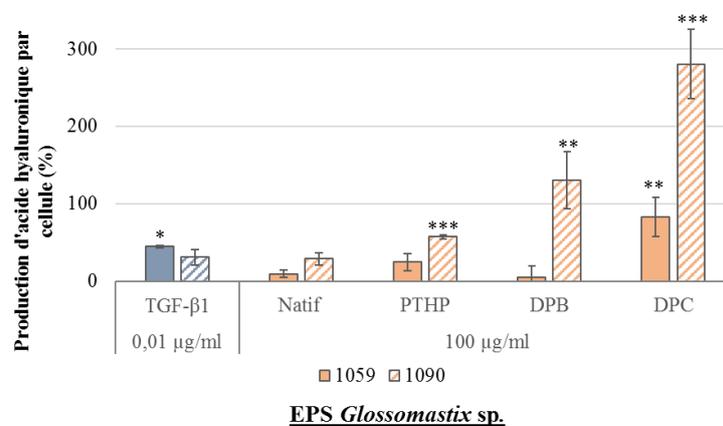


Figure 58 : Effets des différents EPS issus de *Glossomastix sp.* sur la production d'AH extracellulaire par cellule (%).

Les cellules ont été exposées pendant 48 h aux EPS testés à une concentration de 100 µg/ml ou au TGF-β1 à 0,01 µg/ml. Le dosage a été réalisé sur les surnageants cellulaires à l'aide d'un test ELISA. (n : 3 ; N : 3). * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$.

Nous pouvons voir que les lignées ne répondent pas de la même manière avec les différents EPS issus de *Glossomastix* sp.. Comme pour les EPS issus de *Diacronema* sp. seul l'EPS **DPC** issu de *Glossomastix* sp. accroit la synthèse d'AH de **80 %** sur le modèle 1059 alors que les autres EPS sont inactifs. Concernant la lignée **1090**, tous les EPS sont actifs avec une augmentation de la production d'acide hyaluronique en fonction des étapes de dépolymérisation. L'effet de l'EPS **natif** est de **30 %** puis après le prétraitement (**PTHP**) il est de **80 %** et atteint **130 %** avec l'EPS **DPB** et **280 %** avec l'EPS **DPC**.

II. 2. a. v. Effets des différents EPS issus de *Phaeodactylum tricornutum* sur la production d'AH

Les productions d'AH suite à une exposition par les EPS issus de *Phaeodactylum tricornutum* sont rassemblées dans la figure 59 ci-dessous.

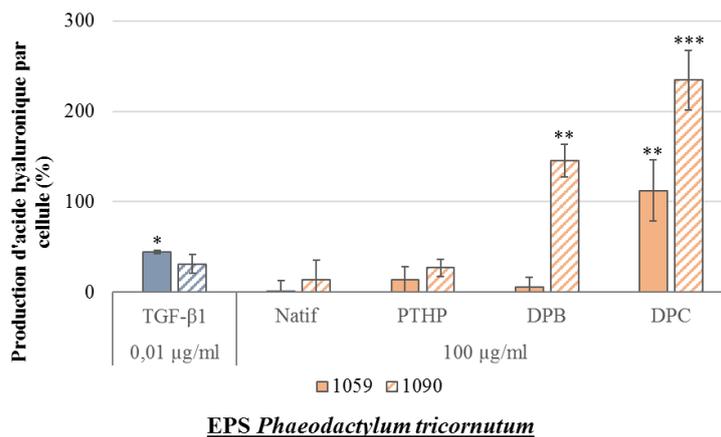


Figure 59 : Effets des différents EPS issus de *Phaeodactylum tricornutum* sur la production d'AH extracellulaire par cellule (%).

Les cellules ont été exposées pendant 48 h aux EPS testés à une concentration de 100 µg/ml ou au TGF-β1 à 0,01 µg/ml. Le dosage a été réalisé sur les surnageants cellulaires à l'aide d'un test ELISA. (n : 3 ; N : 3). * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$.

Nous pouvons voir que les **EPS natifs et PTHP n'ont pas d'impact sur la production d'AH par les deux lignées**. Seule l'EPS **DPC** est actif sur la lignée **1059** avec une synthèse **100 %**. En revanche, les EPS **DPB** et **DPC** stimulent respectivement de **140 %** et **230 %** la synthèse d'AH par la lignée **1090**.

II. 2. a. vi. Effets des différents EPS issus de *Synechococcus sp.* sur la production d'AH

Les effets des différents EPS issus de *Synechococcus sp.* sont rassemblés dans la figure 60.

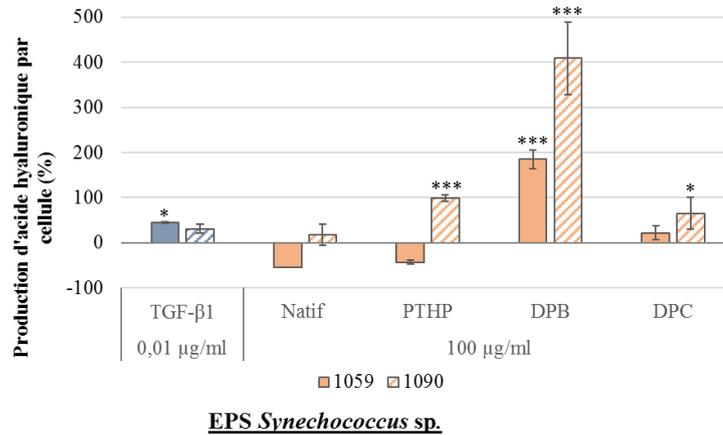


Figure 60 : Effets des différents EPS issus de *Synechococcus sp.* sur la production d'AH extracellulaire par cellule (%).

Les cellules ont été exposées pendant 48 h aux EPS testés à une concentration de 100 µg/ml ou au TGF-β1 à 0,01 µg/ml. Le dosage a été réalisé sur les surnageants cellulaires à l'aide d'un test ELISA. (n : 3 ; N : 3). * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$.

Nous pouvons voir que comme pour les autres EPS, les effets sont variables d'une lignée à l'autre et en fonction des formes. Pour la lignée **1059**, les EPS natifs, PTHP et DPC n'ont pas d'effets positifs. Seul l'**EPS DPB** augmente fortement la production d'AH avec un impact de **200 %**. Hormis l'EPS natif, tous les EPS activent la synthèse d'AH de manière plus ou moins importante. C'est l'EPS **DPB** qui est le plus actif avec **400 %** d'AH produit par les cellules **1090**.

Conclusion

Les **7 EPS** que nous avons étudiés dans ce projet **ont des effets sur la sécrétion d'acide hyaluronique avec des réponses plus importantes sur le modèle 1090 (46 ans)**. Les EPS dépolymérisés sont majoritairement les plus actifs. Des différences de réponses en fonction du système de dépolymérisation choisi sont aussi notées confirmant l'hétérogénéité des fragments déjà mise en évidence lors de l'étude sur la production de collagène. Les **EPS les plus intéressants** pour accroître les sécrétions d'AH par le **modèle 1090** sont ceux issus de ***Porphyridium cruentum*, *Diacronema sp.*, *Glossomastix sp.*, *Phaeodactylum tricornutum* et *Synechococcus sp.*** Contrairement à la production de collagène, ces 7 EPS pourraient donc être recommandés pour un panel de consommateur dont l'âge est proche de 46 ans.

II. 2. b. Analyse en composante principale

Comme pour la production de collagène, nous avons réalisé une ACP avec les mêmes paramètres énoncés précédemment (Figure 61) afin de mettre en évidence des corrélations potentiels entre les effets sur la sécrétion d'acide hyaluronique et les éléments structuraux dont nous disposons actuellement. **Tout comme la synthèse de collagène, cette sécrétion d'acide hyaluronique est corrélée avec le pourcentage d'acide uronique présent dans les EPS.** Le taux de groupement sulfate ainsi que la réduction du poids moléculaire ne semblent pas être nécessaire pour cette activité biologique. Tout comme pour la production de collagène, la représentation des individus met en évidence deux groupes respectivement formés par les EPS natifs et dépolymérisés.

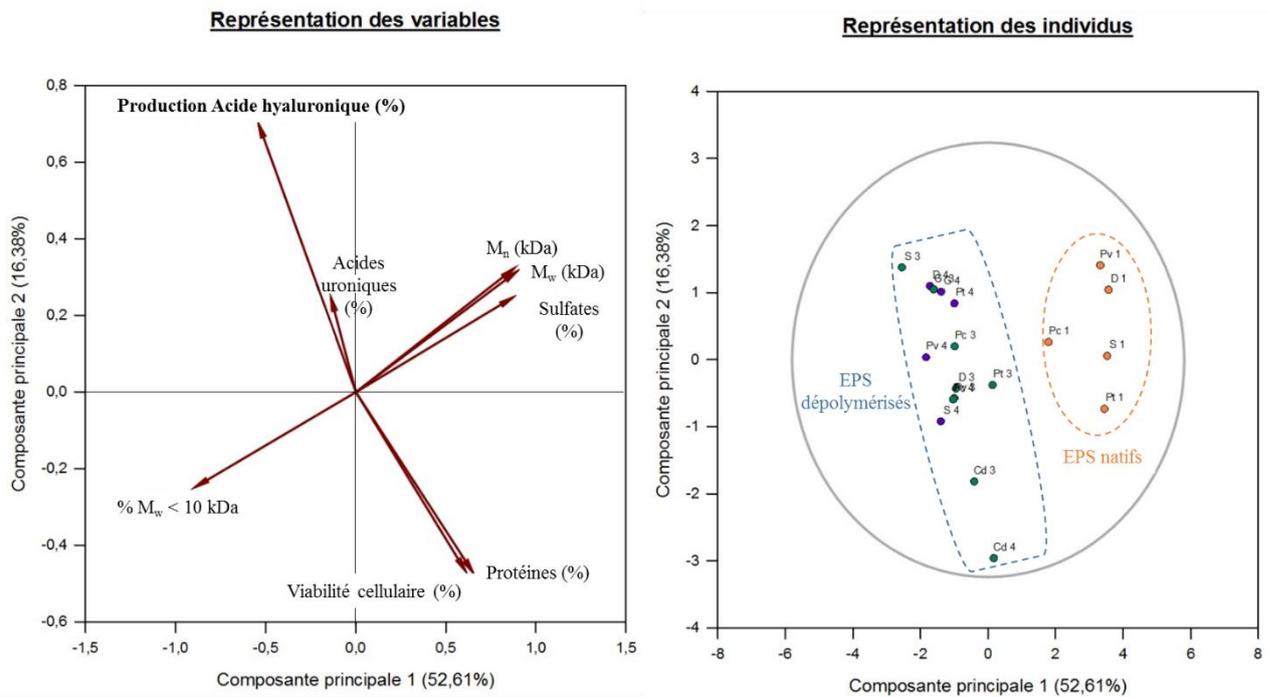


Figure 61 : Analyse en composante principale (Sigma plot) des productions d'acide hyaluronique et des éléments structuraux des EPS.

Avec : 1 : EPS natif ; 2 : EPS DPB ; 3 : EPS DPC ; Pc : *Porphyridium cruentum* ; Cd : *Chrysolita dentata* ; Pv : *Pavlova* sp. ; G : *Glossomastix* sp. ; Pt : *Phaeodactylum tricornutum* ; S : *Synechococcus* sp.

II. 2. c. Discussion générale

Nous avons pu mettre en évidence que ces EPS, testés à une concentration de 100 µg/ml, induisaient **des effets différents selon leurs origines, leurs formes et les modèles cellulaires.** Tout d'abords, les EPS ne sont pas tous actifs sur les fibroblastes issus d'une femme de 20 ans (1059). C'est le cas, par exemple, de celui produit par *Chrysolita dentata* et la majorité des EPS issus de *Synechococcus* sp. En revanche, tous les EPS induisent une augmentation de la synthèse d'AH par les cellules issues d'une femme de 46 ans (1090).

Dans la matrice extracellulaire (MEC), la concentration en AH est médiée par **ses voies de synthèse et de dégradation**. La première voie est assurée par les **hyaluronates synthétases** (HAS) qui sont au nombre de 3 chez les mammifères mais dont 2, HAS 2 et HAS 3 sont majoritairement retrouvées dans le derme. La seconde voie est médiée par les 6 **hyaluronidases** (HYAL) dont HYAL-1 et HYAL-2 qui initient la fragmentation de l'AH dans le derme. Elle se déroule au niveau du récepteur CD44 sur lequel l'AH vient se fixer pour ensuite être clivé par la HYAL-2. Une autre dégradation non enzymatique a été mise en évidence principalement au niveau des sites inflammatoires ou des lésions tissulaires par l'action des ROS (Gall, 2010).

Dans le vieillissement cutané intrinsèque, il a été démontré que la réduction d'AH était liée à une diminution de sa synthèse avec une sous-expression du gène codant pour HAS 2 (Tzello et al., 2011). En revanche, sa dégradation reste inchangée avec des niveaux d'expression des HYAL 2 et HYAL 1 semblables dans des fibroblastes issus de donneurs de 0 à 77 ans (Terazawa et al., 2015). En revanche, l'expression du récepteur CD44 est réduite (Papakonstantinou et al., 2012).

Le témoin positif de notre étude est le TGF- β 1, testé à une concentration de 0,01 μ g/ml pendant 48 h sur nos deux modèles cellulaires. Nous avons obtenu une augmentation du contenu d'AH dans les surnageants de 40 % sur le modèle 1059 et de 30 % sur les 1090. Dans la littérature, le mécanisme d'action de cette cytokine a déjà été décrit. En effet, une première étude a mis en évidence que le TGF- β 1, testé à une concentration de 0,01 μ g/ml pendant 6 h sur des fibroblastes issus de la membrane synoviale de rat, augmentait le contenu d'AH en stimulant l'expression du gène codant pour l'HAS 2. En revanche, aucun changement n'a été observé sur l'expression de HAS 3 (Tanimoto et al., 2004). Une seconde étude a confirmé ces résultats en démontrant des augmentations des expressions des gènes codant pour HAS 1 et HAS 2 sur des fibroblastes dermiques humains normaux à des concentrations comprises entre 0,005 à 0,2 μ g/ml (Campo et al., 2007). Ainsi, sur nos modèles cellulaires, le TGF- β 1 agit vraisemblablement de la même manière et la différence obtenue entre les deux lignées pourraient être due à une sous-expression du gène codant pour HAS 2 chez les cellules de 46 ans. **Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les EPS exerçant un effet sur les deux modèles cellulaires pourraient agir de la même manière que le TGF- β 1 en stimulant la voie de synthèse de l'AH avec la surexpression de l'enzyme HAS 2.**

En revanche, la majorité de ces EPS ont un effet plus marqué sur la lignée 1090, ce qui est différent de notre témoin positif et laisse donc à penser que d'autres voies métaboliques comme la dégradation de l'AH pourraient intervenir. La dégradation de l'AH dans la MEC peut

être non enzymatique avec l'intervention des ROS, ou enzymatique avec l'implication des HYAL et du récepteur CD44.

Quand le fibroblaste vieillit, sa morphologie change avec une réduction de la force tension conduisant à une structure plus rétrécit. Une des conséquences de ce changement de forme est la production de ROS par les mitochondries fibroblastiques (Shin et al., 2019). Nous pouvons donc sous-entendre que les effets marqués de nos EPS sur les cellules âgées de 46 ans sur la synthèse d'AH seraient médiés par **une action antioxydante en bloquant les ROS potentiellement produits**. Ceci rejoint les données de la littérature qui mentionnent le potentiel antioxydant d'EPS de microalgues comme celui issu de *Porphyridium cruentum* (Tannin-Spitz et al., 2005). **Ces 7 EPS que nous étudions, comme mentionné pour la synthèse de collagène, pourraient rétablir la force de tension afin de redonner une forme étendue des cellules, ce qui pourrait avoir pour conséquence d'inhiber la synthèse de ROS.**

La dégradation enzymatique de l'AH dans la MEC s'effectue par les HYAL 1 et 2. Des polysaccharides sont maintenant connus pour inhiber ces enzymes. Par exemple, le dextrane sulfate, testé à une concentration de 400 µg/ml sur des cellules du cancer du sein (MDA-MD-231), a induit une réduction de la dégradation de l'AH extracellulaire en inhibant les HYAL (Udabage et al., 2003). De plus, des cinétiques enzymatiques réalisées à l'aide de HYAL issus de bovin, de serpent ou de bactérie ont mis en avant le pouvoir inhibiteur des polysaccharides sulfatés comme l'héparine, l'héparane sulfate et le chondroïte sulfate ainsi que des non sulfatés comme le chitosane et l'acide alginique (Girish et al., 2009). Ce dernier inhiberait les HYAL par sa ressemblance structurale avec l'acide hyaluronique (Asada et al., 1997). **Ces EPS pourraient ainsi réduire la dégradation de l'AH en inhibant les HYAL extracellulaires.**

Conclusion

La sur-excrétion d'AH par nos deux modèles cellulaires peut être due à **une activation de sa synthèse ou une inhibition de sa dégradation**. Dans la première hypothèse, ces EPS **activeraient l'enzyme HAS 2** responsable de la synthèse d'AH dans le derme. Pour la seconde supposition, la diminution de la dégradation serait médiée par un **effet antioxydant des EPS ou par une inhibition des HYAL**. L'action de ces EPS peut aussi être une combinaison de ces deux propositions.

III. Effets d'EPS de microalgues sur les voies de dégradation des composants du derme

Un autre moyen de lutter contre le vieillissement cutané est d'inhiber la dégradation des fibres de collagène et de l'acide hyaluronique en bloquant les enzymes impliquées dans ce clivage. Les métalloprotéases (MMP) dégradent les fibres de collagène alors que les hyaluronidases (HYAL) s'attaquent à l'acide hyaluronique. Nous avons fait le choix de réaliser des études enzymatiques à partir de la MMP-1 humaine pour le collagène et la HYAL de type I bovine pour l'acide hyaluronique.

III. 1. Effets d'EPS de microalgues sur l'inhibition de la métalloprotéase 1 (MMP-1) humaine

La MMP-1 est à la base de la dégradation du collagène car c'est la seule enzyme capable de fragmenter les fibres de collagène. Pour ce test, le témoin positif est le **piroxicam** qui est une molécule médicamenteuse principalement utilisée pour ses propriétés anti-inflammatoires (Leite, 2009). Les **EPS** ainsi que le **piroxicam** ont été évalués à une concentration de **100 µg/ml** et les pourcentages d'inhibition ont été calculés à l'aide des vitesses initiales obtenues grâce aux cinétiques enzymatiques. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure 62 ci-dessous.

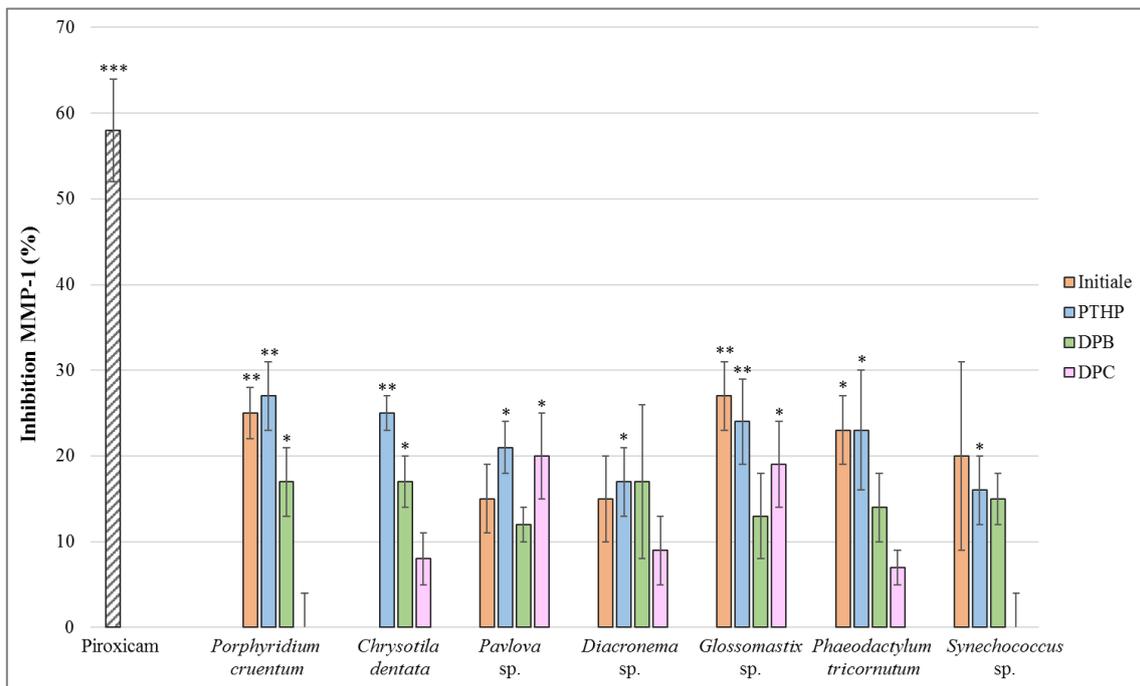


Figure 62 : Effets des différents EPS et du Piroxicam sur l'activité de la MMP-1 humaine.

Les potentiels inhibiteurs ont été testés à une concentration de **100 µg/ml**. Les expériences ont été réalisées 5 fois de manière indépendantes. * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.01$

Le **piroxicam**, utilisé comme référence (Leite, 2009) ici testé à une concentration de 100 µg/ml inhibe la MMP-1 humaine de notre étude de **58 %**.

En ce qui concerne les différents EPS, **nous pouvons voir qu'ils inhibent l'activité enzymatique de cette MMP-1 humaine**. Pour rappel, les données de mortalité cellulaire obtenues avec l'EPS natif issu de *Chrysotila dentata* ne permettent pas une potentielle application dermo-cosmétique et de ce fait, son pouvoir inhibiteur ne sera pas présenté.

Tous les EPS natifs inhibent la MMP-1 avec des pourcentages d'inhibition compris entre **15 %** pour les EPS *Pavlova* sp. et *Diacronema* sp. et **27 %** pour celui produit par *Glossomastix* sp.. Après la première étape de la méthode de dépolymérisation (**PTHP**), **l'inhibition enzymatique est conservée**. Les résultats obtenus avec les deux systèmes de dépolymérisation sont différents. En effet, les **EPS DPB** issus de *Pavlova* sp. et *Diacronema* sp. conservent leur potentiel inhibiteur de **15 %** mais pour les autres comme celui issu de *Porphyridium cruentum* ou *Glossomastix* sp. ils sont réduits passant de **25 % à 17 %** pour l'EPS modèle et de **27 % à 13 %** pour l'autre. En revanche, pour les EPS DPC, les inhibitions induites par les EPS disparaissent à l'exception de ceux issus de ***Pavlova* sp. et *Glossomastix* sp.** Ces deux EPS sont les seuls pour lesquels les 4 formes ont un pouvoir inhibiteur de la MMP-1.

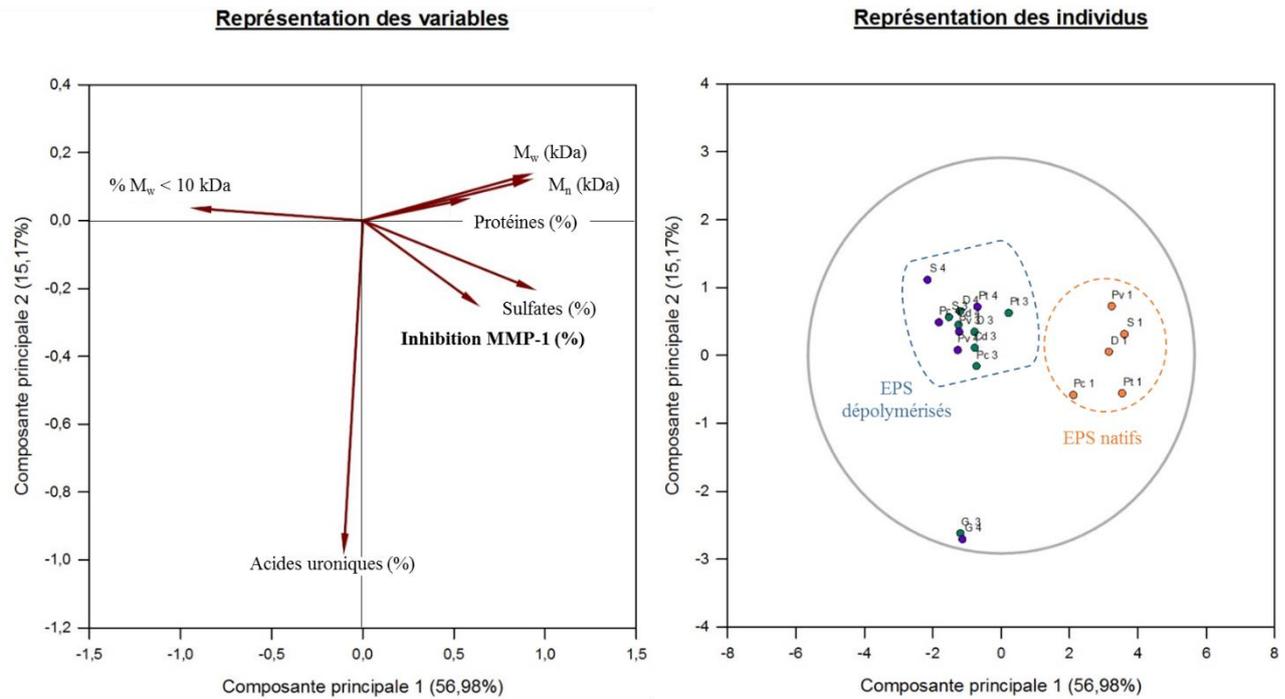


Figure 63 : Analyse en composante principale (Sigma plot) des inhibitions de la MMP-1 et des éléments structuraux des EPS.

Avec : 1 : EPS natif ; 2 : EPS DPB ; 3 : EPS DPC ; Pc : *Porphyridium cruentum* ; Cd : *Chrysolita dentata* ; Pv : *Pavlova* sp. ; G : *Glossomastix* sp. ; Pt : *Phaeodactylum tricornutum* ; S : *Synechococcus* sp.

L'ACP est réalisée avec les mêmes paramètres structuraux utilisés pour la production de collagène. Alors que la production de collagène *in vitro* semble être corrélée aux taux d'acides uroniques, ces derniers ne semblent pas avoir un rôle dans l'inhibition de la MMP-1. En revanche, le **taux de groupement sulfate** qui précédemment ne semblait pas influencer la synthèse de collagène par les fibroblastes dermiques humains, **serait corrélé à l'inhibition de cette protéase cytoplasmique** (Figure 63).

Dans la littérature, les inhibiteurs synthétiques de la MMP-1 contiennent des groupements comme des hydroxamates, des carboxylates, des sulfhydriles ou bien des thiols. Ils agissent de façon compétitive interagissant avec les ions Zn^{2+} contenus dans le site actif par l'intermédiaire, par exemple de liaisons hydrogènes (Leite, 2009). Ainsi les **activités induites par nos EPS pourraient provenir de la présence des groupements carboxyliques** contenus, entre autres, au **niveau des acides uroniques et/ou des groupements sulfates**. La perte d'activité avec la dépolymérisation serait associée à **la disparition des groupements sulfates**. Les polysaccharides n'ont fait l'objet que de peu d'études sur l'inhibition des MMP. Une équipe a étudié l'effet de l'EPS issu de *Porphyridium cruentum* sur une collagénase bactérienne à des concentrations comprises entre 250 et 2500 $\mu\text{g/ml}$. Les auteurs n'ont mesuré aucun effet inhibiteur de cet EPS sur ce modèle (Diaz Bayona et al., 2012). En revanche, une équipe a mis

en avant les capacités inhibitrice d'EPS bactériens sur une collagénase mais n'a mis aucun mécanisme d'action en avant (Shirzad et al., 2018).

Conclusion

Tous les **EPS natifs** inhibent la MMP-1 de notre étude entre **15 %** et **27 %**. Cette activité est **fortement réduite après les dépolymérisations**. Seuls les EPS issus de *Pavlova sp.* et *Glossomastix sp.* sont tous actifs. L'ACP et les données actuelles présentes dans la littérature laisse penser que la capacité inhibitrice de nos EPS serait médiée par le **taux de groupements sulfates**.

III. 2. Effets d'EPS de microalgues sur l'inhibition de la hyaluronidase de type I bovine

L'inhibition des hyaluronidases est une explication potentielle pour justifier une augmentation de la concentration extracellulaire de l'AH. Nous avons mené une étude *in vitro* en réalisant des cinétiques enzymatiques à l'aide d'une HYAL de type I bovine. Ces 7 EPS et le témoin positif, l'héparine, ont été testés à **100 µg/ml**. Les pourcentages d'inhibition obtenus à partir des pentes des cinétiques enzymatiques sont rassemblés dans la figure 64 ci-dessous. Le nombre de répliques est de 2 pour cette expérience et n'est donc pas suffisant pour réaliser une étude statistique.

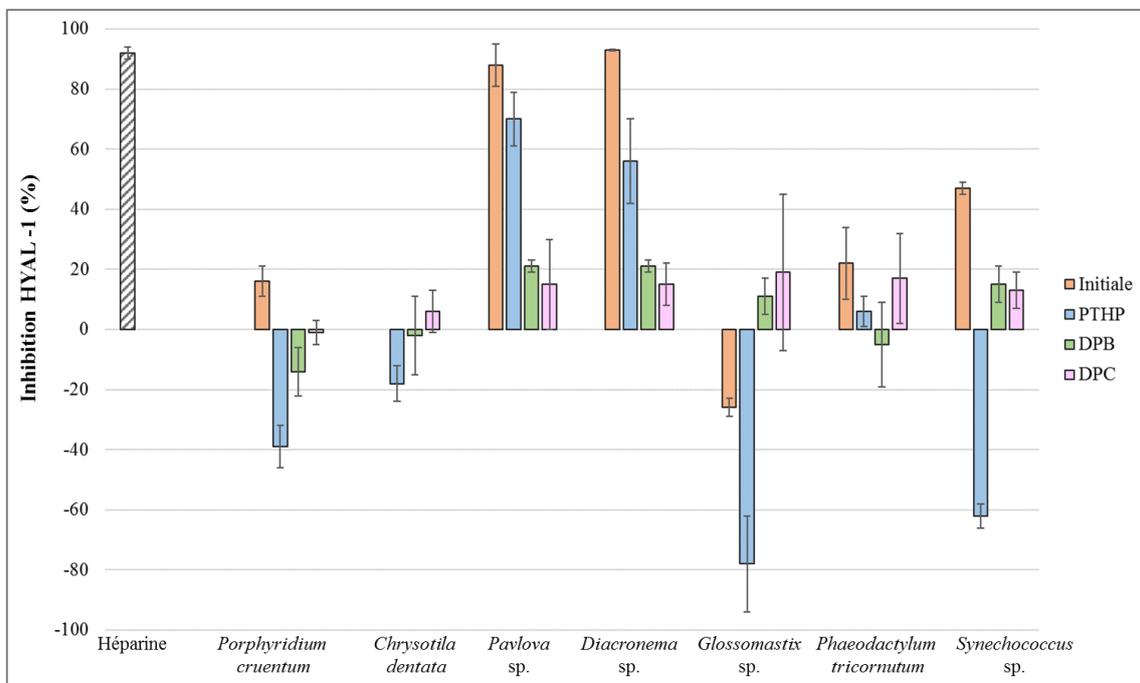


Figure 64 : Effets des différents EPS et de l'héparine sur l'activité de la HYAL-1 bovine.

Les potentiels inhibiteurs ont été testés à une concentration de **100 µg/ml**. Les expériences ont été réalisées 2 fois de manière indépendantes. Le nombre de répliques ne permet donc pas de réaliser une étude statistique.

Nous pouvons voir qu'à **100 µg/ml**, l'**héparine** inhibe de **92 %** la **HYAL-1** bovine. Ce résultat est cohérent avec une précédente étude qui avait déterminé son IC_{50} à 10 µg/ml pour un modèle enzymatique de même origine (Isoyama et al., 2006). La capacité inhibitrice des 7 EPS de cette étude varie en fonction de leur source et de leur forme. Tout d'abord, les **EPS produits par *Chrysotila dentata* et *Phaeodactylum tricornutum* n'entraînent pas d'inhibition de ce modèle enzymatique**. Pour ceux produit par *Pavlova* sp. et *Diacronema* sp. la diminution de la taille et/ou la perte des groupements sulfates diminuent l'inhibition. Les **EPS natifs** contiennent 10 % de groupements sulfates, ont des M_w de l'ordre de 6000 kDa et **inhibent entre 88 % et 93 % la HYAL-1 bovine**. Après dépolymérisation, où les taux de groupements sulfates sont inférieurs à 1 % et les M_w aux alentours de 100 kDa pour l'EPS de *Pavlova* sp. et de 1000 kDa pour celui de *Diacronema* sp., les inhibitions ne sont plus que de 20 %. En revanche, pour l'EPS issu de *Glossomastix* sp., les résultats sont inversés. En effet, la forme native active l'enzyme avec une inhibition de -26 % alors que les EPS DP l'inhibent de 11 % et 19 %.

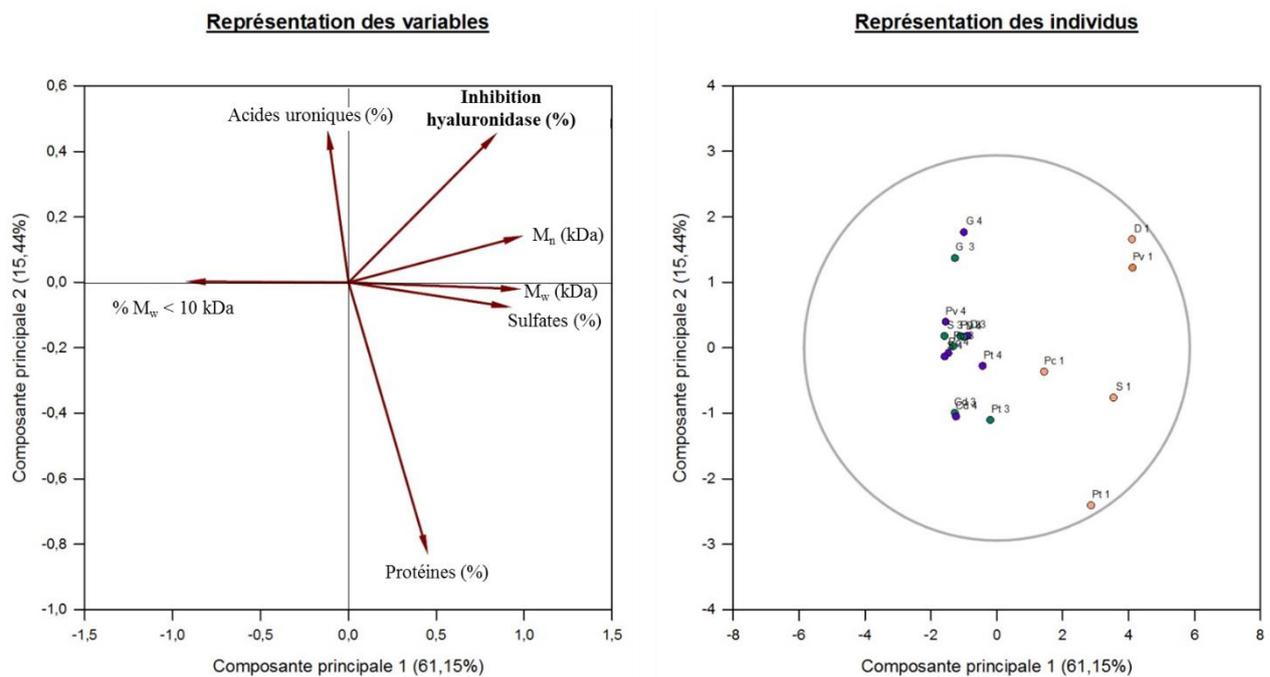


Figure 65 : Analyse en composante principale (Sigma plot) des inhibitions de la HYAL de type I bovine et des éléments structuraux des EPS.

Avec : 1 : EPS natif ; 2 : EPS DPB ; 3 : EPS DPC ; Pc : *Porphyridium cruentum* ; Cd : *Chrysotila dentata* ; Pv : *Pavlova* sp. ; G : *Glossomastix* sp. ; Pt : *Phaeodactylum tricornutum* ; S : *Synechococcus* sp.

L'ACP (Figure 65) a été effectuée avec les mêmes paramètres structuraux que les précédentes. Nous pouvons voir que, contrairement à la sécrétion *in vitro* d'acide hyaluronique par les fibroblastes dermiques humains qui semble être corrélées aux acides uroniques,

l'inhibition de la hyaluronidase semble être mise en relation avec la masse moyenne en nombre. La représentation des individus ne permet pas de mettre en évidence des populations distinctes ce qui traduit que **les informations structurales dont nous disposons ne sont pas suffisantes pour établir une relation structure-fonction.**

Les polysaccharides sont actuellement connus pour inhiber les hyaluronidases de par leur groupement sulfate, leur masse ou bien encore leur homologie de structure avec l'acide hyaluronique (Girish and Kemparaju, 2005). Par exemple, notre témoin positif, l'héparine, inhibe les hyaluronidases par inhibition compétitive ou non. Pour la non-compétitive, il se fixerait à des sites différents de l'actif via des interactions électrostatiques créées par ces charges négatives et les positives de l'enzyme ce qui aurait pour conséquence de bloquer la fixation de l'AH (Girish and Kemparaju, 2005; Maksimenko et al., 2001). **Ainsi les charges négatives, apportées par les groupements sulfates et les acides uroniques seraient des éléments structuraux importants pour l'inhibition de cette enzyme.** Cela pourrait être une explication possible pour les EPS natifs les plus actifs. En effet, les EPS natifs de *Diacronema* sp. et *Pavlova* sp. qui sont les plus inhibiteurs (93 % et 88 %) contiennent 16 % et 4 % d'acides uroniques et 10 % de groupements sulfates. **La diminution d'activité serait corrélée avec la perte des groupements sulfates mais la conservation des groupements uroniques expliquerait l'activité des formes dépolymérisées.** Pour l'EPS issu de *Synechococcus* sp. l'activité de 47 % serait induite par les 18 % de groupements sulfates car aucun acide uronique n'a été détecté.

Les charges négatives ne sont pas le seul élément structural responsable de l'activité inhibitrice car par exemple, EPS natif issu de *Glossomastix* sp. n'a aucun effet alors qu'il contient 13 % de groupements sulfates et 27 % d'acides uroniques. La taille du polysaccharide est aussi un facteur important. En effet, une étude sur des oligosaccharides d'héparane sulfate a mis en avant une inhibition maximale avec des oligosaccharides de 16 à 20 saccharides comparativement à ceux de 4 à 10 saccharides. Ces oligosaccharides agiraient par contre de manière compétitive (Toida et al., 1999). **Les formes dépolymérisées de l'EPS issu de *Glossomastix* sp. induiraient cette inhibition qui ne semble pas être possible avec la forme native.**

Conclusion

Tous les EPS de notre étude **n’ont pas la faculté d’inhiber la HYAL-I. Tous les EPS** issus de *Pavlova sp.* et de *Diacronema sp.* **inhibent cette enzyme.** Les éléments structuraux connus actuellement ne permettent pas de conclure sur une relation structure-fonction. Néanmoins, les informations connues dans la littérature laissent penser que les groupements sulfates et les acides uroniques pourraient intervenir dans le potentiel inhibiteur des EPS.

IV. Analyse des transcrits ciblant la production de collagène

Nous venons de mettre en évidence que nos EPS avaient un potentiel anti-âge en stimulant les synthèses de collagène et d’acide hyaluronique avec des effets plus importants pour les EPS dépolymérisés. Nous avons également montré que ces EPS pouvaient aussi inhiber des enzymes impliquées dans la dégradation de ces macromolécules. Nous avons en plus souhaité étudier le mécanisme d’action de certains EPS sur la production de collagène. Pour cela, nous avons fait le choix de réaliser une étude préliminaire des transcrits à partir de matériel génétique issu des fibroblastes **1059 (20 ans)**. Les EPS de cette étude sont ceux issu de *Glossomastix sp.* et *Synechococcus sp.* dépolymérisés à l’aide du système batch (**EPS DPB**). Pour rappel, ces deux EPS DPB induisaient sur ce modèle des augmentations de collagène respectivement de **150 %** et de **200 %**. Les fibroblastes de 20 ans ont été exposés pendant 48 h à 100 µg/ml d’EPS DPB puis les ARNm ont été extraits et transcrits en ADNc afin de réaliser les RT-qPCR.

Les gènes que nous avons choisis sont impliqués dans les voies de synthèse ou de dégradation du collagène et sont regroupés dans le tableau 13 ci-dessous.

Tableau 13: Gènes choisis pour l'étude des mécanismes d'action des EPS DPB issus de *Glossomastix sp.* et *Synechococcus sp.* sur la production de collagène.

	Symbole	Nom du gène
Voie de synthèse	TGF-β1	Facteur de croissance transformant- β1
	TGF-β1 BR1	Récepteur BR1 du TGF-β1
	TGF-β1 BR2	Récepteur BR2 du TGF-β1
	SMAD 2	Protéine SMAD 2
	SMAD 7	Protéine SMAD 7
	SMAD 4	Protéine SMAD 4
Voie de dégradation	MMP 1	Métalloprotéase-1
	MMP 3	Métalloprotéase-1
	TIMP 1	Inhibiteur tissulaire 1 des MMP
Collagènes du derme	COL1A1	Collagène de type I chaîne α1
	COL 3A1	Collagène de type III chaîne α1
Gène de ménage	GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

La **voie de synthèse** est celle du **TGF- β 1 associé aux protéines SMADs** avec les gènes codant pour le TGF- β 1, son récepteur BR1 et BR2, les SMADs 2, 7 et 4. Pour la **dégradation** du collagène, nous avons regardé les **MMP1** et **MMP3** ainsi que l'un de leurs inhibiteurs, le **TIMP1**. Nous avons aussi regardé les niveaux d'expression des collagènes de types I et III qui sont les formes majoritaires du derme. Le gène de ménage qui permet de normaliser les résultats de cette étude est celui codant pour la GAPDH.

Les niveaux d'expression des cellules non exposés aux EPS ont été ramenés à 0 afin de mettre en évidence des sur- ou sous-expressions induites par nos polymères DPB. Le nombre de réplicats expérimentaux est de N : 1 et N : 2 respectivement pour les EPS DPB issus de *Glossomastix sp.* et *Synechococcus sp.*. Ceci n'est pas suffisant pour réaliser une étude statistique mais permet de donner une première approche du mécanisme d'action de ces EPS DPB.

➤ **EPS DPB de *Glossomastix sp.***

La figure 66 représente les niveaux d'expression en log 2 des gènes après une exposition des cellules à l'EPS DPB issus de *Glossomastix sp.*.

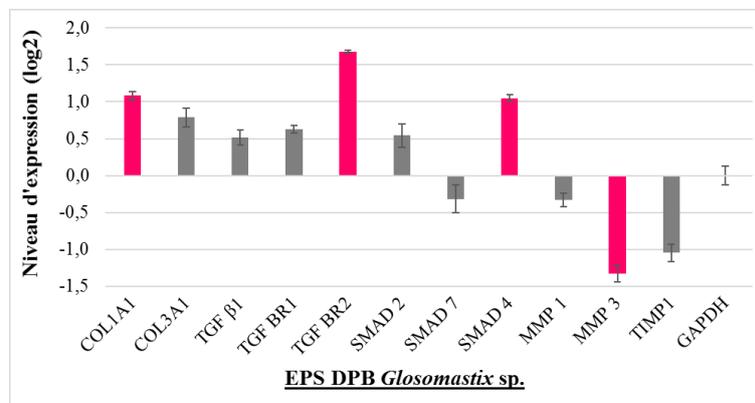


Figure 66 : Niveau d'expression des gènes impliqués dans la **synthèse** et la **dégradation** du **collagène** après une exposition des **fibroblastes 1059** à l'EPS DPB issu de *Glossomastix sp.* (100 μ g/ml) pendant 48 h (N : 1).

En général, un gène sera sur- ou sous-exprimé lorsque son niveau d'expression est en valeur absolue au-dessus de 1 (Livak and Schmittgen, 2001).

D'après cette étude préliminaire, nous pouvons voir que l'EPS DPB issu de *Glossomastix sp.* induirait une **surexpression** des gènes codant pour le **collagène de type I** (COL1A1), le **récepteur BR2** (TGF BR2) et la **protéine SMAD 4** (SMAD 4). En parallèle, la métalloprotéase-3 semblerait être sous-exprimée par l'EPS DPB issu de *Glossomastix sp.*

traduisant une diminution de la dégradation du collagène. L'EPS DPB stimulerait donc la **voie du TGF- β 1** ayant pour conséquence d'**accroître la production de collagène**. En plus de cela, l'**inhibition de la dégradation du collagène** via la sous-expression de la MMP-3 aurait aussi pour conséquence d'**augmenter la concentration de collagène** dans le derme.

➤ **EPS DPB de *Synechococcus sp.***

La figure 67 illustre les niveaux d'expression après une exposition à l'EPS DPB issu de *Synechococcus sp.* pendant 48 h.

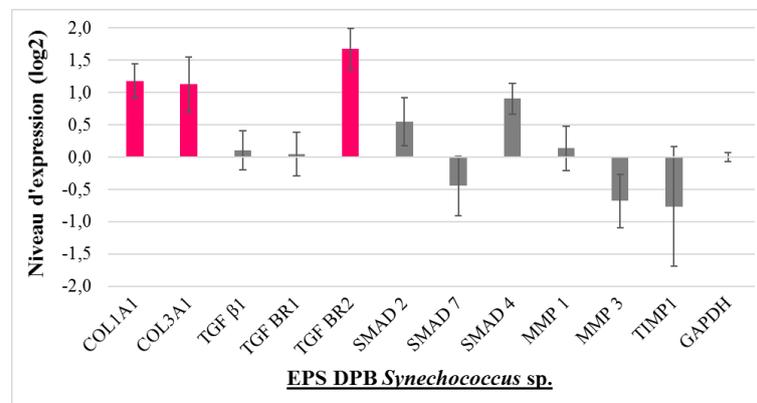


Figure 67 : Niveau d'expression des gènes impliqués dans la **synthèse** et la **dégradation** du **collagène** après une exposition des **fibroblastes 1059** à l'**EPS DPB** issu de *Synechococcus sp.* (100 μ g/ml) pendant 48 h (N : 2).

D'après ce résultat préliminaire, nous observons que l'EPS DPB issu de *Synechococcus sp.* semble induire une **surexpression des gènes** codant pour les **deux collagènes principaux du derme** (COL1A1 et COL3A1) et pour le récepteur **TGF BR2** (TGF BR2). Contrairement à l'EPS DPB de *Glossomastix sp.*, cet EPS ne semble pas inhiber l'expression des enzymes responsables de la dégradation du collagène et stimulerait uniquement sa production.

Ainsi cette première étude semble confirmer l'**hypothèse que les augmentations de production de collagène induites par ces EPS seraient la conséquence de l'activation de la voie du TGF- β 1 associé aux protéines SMADs**. La figure 68 schématise cette proposition de mécanisme avec l'effet des EPS sur cette voie métabolique connue dans la littérature (Schmierer and Hill, 2007). Le TGF- β 1 se fixe sur le récepteur BR2 phosphorylé qui s'associe ensuite au BR1. Le complexe formé phosphoryle les protéines SMAD 2 et 3 assemblées qui se couplent ensuite à la protéine SMAD 4. Ces 3 SMADs phosphorylées sont ensuite importées dans le noyau où elles peuvent activer le gène codant pour le collagène de type I.

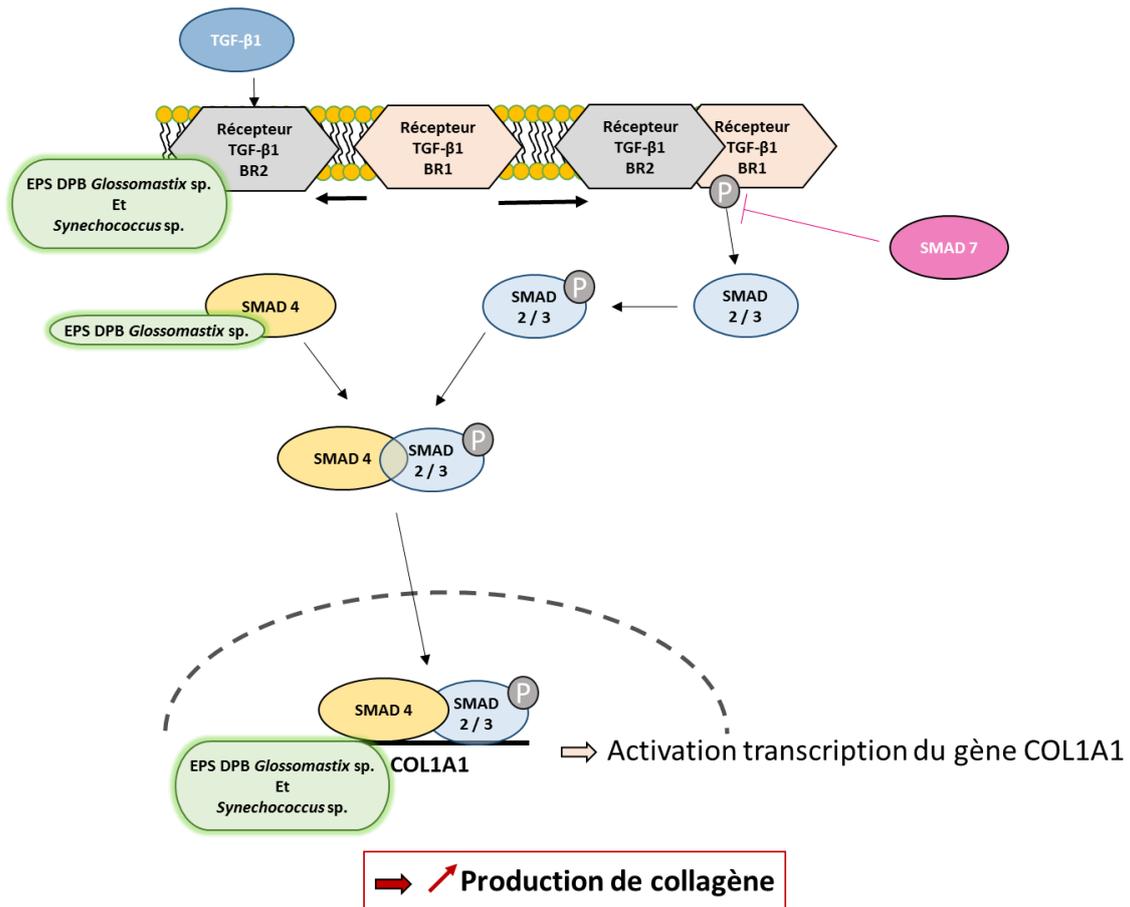


Figure 68 : Représentation schématique et simplifiée de la voie du TGF- β1 associée aux protéines SMADs avec le possible effet des EPS DPB issus de *Glossomastix sp.* et *Synechococcus sp.*

Conclusion

Ces résultats ne sont qu'une première approche pour mettre en évidence le mode d'action de ces EPS dépolymérisés. Néanmoins, ils laissent penser que nos **EPS augmenteraient la production de collagène en activant la voie de synthèse par le TGF-β associé aux protéines SMADs.**

Conclusion Partie 2 : Evaluation du potentiel anti-âge d'EPS de microalgues.

- Les EPS ont induit une **diminution des viabilités cellulaires** des fibroblastes issus de femmes de 20 ans et 46 ans. Cependant, **aucun changement morphologique** n'a été observé hormis pour l'EPS natif issu de *Chrysothila dentata*.
- La mortalité cellulaire a donc été évaluée et **aucun EPS** ne l'augmente hormis la **forme native de l'EPS issu de *Chrysothila dentata*** qui n'a donc pas été testée pour les activités dermo-cosmétiques.
- Les effets des EPS sur la concentration de collagène dans le derme sont schématisés par la figure 69.

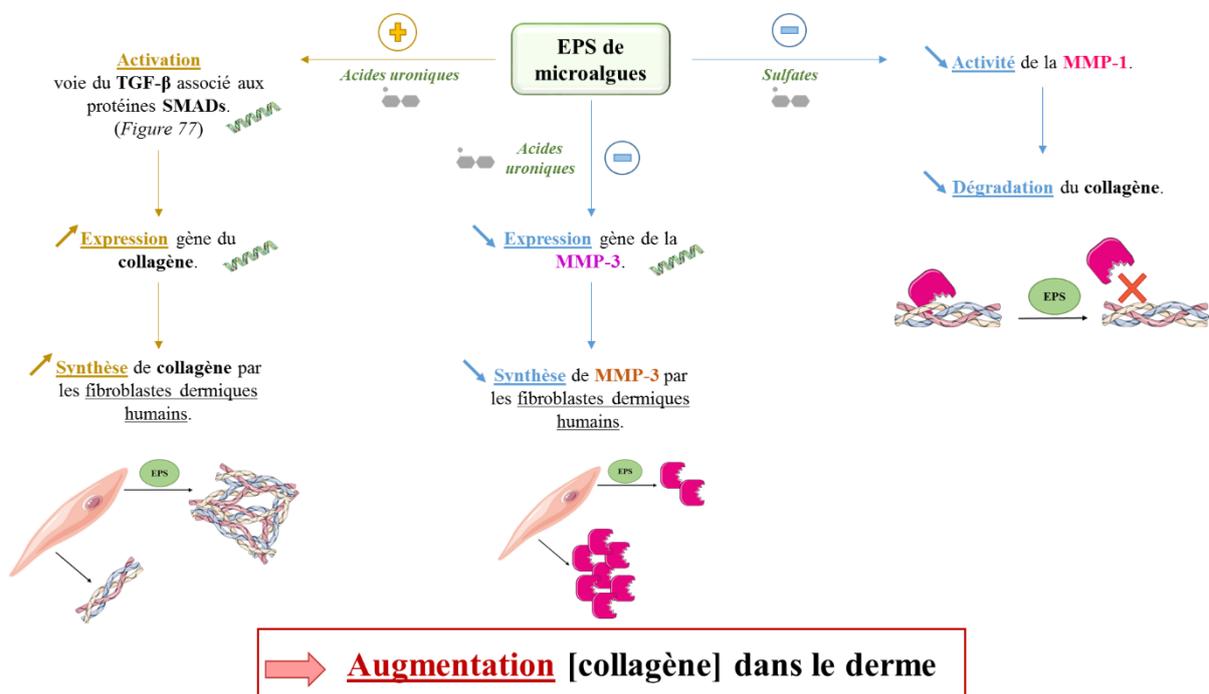


Figure 69 : Effets des EPS sur la concentration en collagène du derme.

Les EPS à une concentration de **100 µg/ml** ont **augmentés les productions de collagènes** sur les deux modèles cellulaires avec des réponses **plus importante sur le modèle de 46 ans** (1090). Ils permettent donc de lutter contre le vieillissement précoce et tardifs. **Comparativement à l'AH**, les EPS induisent des augmentations en général **plus intenses** alors qu'ils sont 10 fois moins concentrés. D'après l'ACP réalisée avec les informations structurales actuellement connues, la production de collagène serait médiée par le taux d'**acides uroniques**. Une **analyse des transcrits** a permis de mettre en évidence que l'augmentation de la concentration de collagène est due à une activation de **sa voie de synthèse par le TGF-β1 et les protéines SMADs**. En parallèle, l'**inhibition de l'expression de la protéine MMP-3** permet de réduire la dégradation du collagène. En plus

de cela, les **EPS inhibent la MMP-1** permettant de réduire la dégradation du collagène. L'ACP réalisée pour cette activité biologique a montré l'importance des **groupements sulfates** contrairement à la synthèse de collagène qui nécessite des acides uroniques.

- Les effets des EPS sur la concentration d'acide hyaluronique du derme sont schématisés par la figure 70.

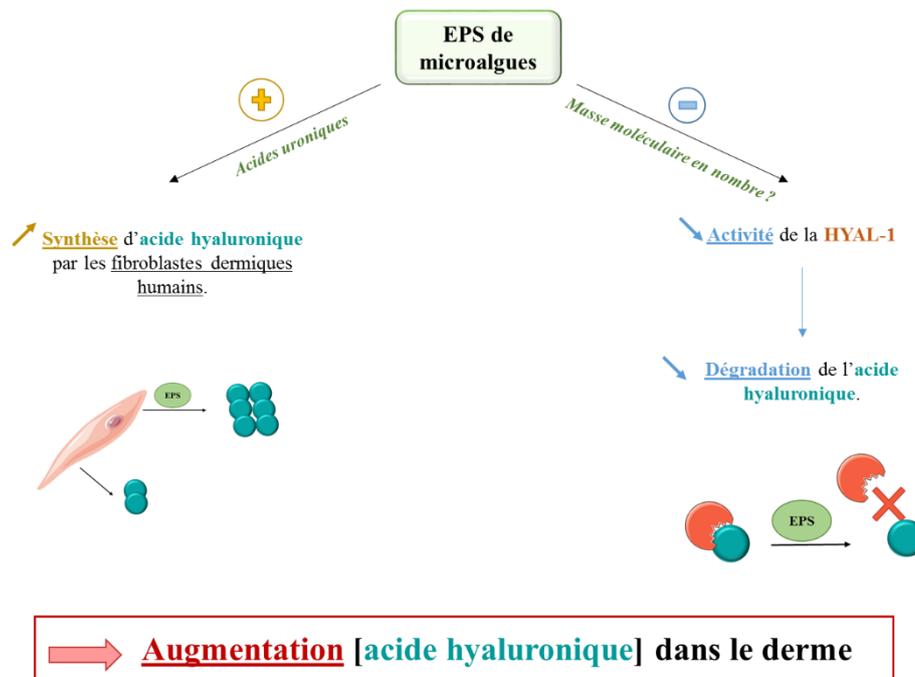


Figure 70 : Effets des EPS sur la concentration en acide hyaluronique.

Les **EPS**, à une concentration de **100 µg/ml**, augmentent les **sécrétions d'AH** par les deux modèles cellulaires mais les réponses sont plus **importantes sur le modèle issu d'une femme de 46 ans (1090)**. Pour l'acide hyaluronique, les formulations dermo-cosmétiques seront donc pour des peaux matures. Tout comme la production de collagène, l'ACP a mis en évidence l'importance des **acides uroniques** pour cette activité. En parallèle, les EPS inhibent la HYAL-1 réduisant ainsi la dégradation de l'acide hyaluronique. La **représentation des variables** dans l'ACP a mis en corrélation cette inhibition avec la **masse moléculaire moyenne en nombre** mais la **représentation des individus** ne donnant **pas de groupes distinct** laisse penser que d'autres éléments structuraux actuellement non connus interviennent.

- Le tableau 14 ci-dessous met en évidence les EPS qui semblent être les plus intéressants en fonction des activités biologiques testées.

Tableau 14 : EPS les plus intéressants suivant les tests biologiques effectués.

Activités biologiques	Production de collagène	Sécrétion d'acide hyaluronique	Inhibition MMP-1	Inhibition HYAL
EPS les plus intéressants	<i>P. cruentum</i>	<i>P. cruentum</i>	<i>Pavlova</i> sp.	<i>Pavlova</i> sp.
	<i>Glossomastix</i> sp.	<i>Glossomastix</i> sp.	<i>Glossomastix</i> sp.	
	<i>Diacronema</i> sp.	<i>Diacronema</i> sp.		<i>Diacronema</i> sp.
	<i>Synechococcus</i> sp.	<i>Synechococcus</i> sp.		
		<i>P. tricornutum</i>		

Les EPS issus de *Porphyridium cruentum*, *Glossomastix* sp. *Diacronema* et *Synechococcus* sp. ont été les plus actifs pour stimuler les productions de collagène et d'acide hyaluronique par les fibroblastes dermiques humains. Parmi ces EPS, seuls ceux issus de ***Glossomastix* sp.** et ***Diacronema* sp.** ont respectivement inhibé la métalloprotéase 1 et la hyaluronidase de type I et sont ceux qui semblent être les plus intéressants pour lutter contre le vieillissement cutané.

Conclusion générale
&
Perspectives

Conclusion générale

Ces travaux présentés s'intègrent dans le projet ANR POLYSALGUE qui rassemble 5 laboratoires et une entreprise. Son objectif global est de valoriser de nouvelles espèces de microalgues productrices d'exopolysaccharides. Pour cela, des recherches dans les domaines de la rhéologie et des propriétés biologiques sont réalisées. En effet, la littérature actuelle recense de nombreuses études sur les polysaccharides issus de microalgues pour leurs effets antioxydants (Tannin-Spitz et al., 2005), antibactériens (Najdenski et al., 2013), anticancéreux (Sogawa et al., 1998) ou anti-inflammatoires (Dai et al., 2018). C'est dans le cadre de la recherche d'activités biologiques que le laboratoire LIENSs intervient dans ce projet ANR. Dans le cadre de la thèse de Clément Gaignard réalisée à l'Institut Pascal de Clermont-Ferrand, plusieurs espèces de microalgues ont été découvertes pour synthétiser des EPS dont 6 d'entre eux ont fait l'objet des études présentées dans ce manuscrit. Il s'agit des microalgues *Chrysothila dentata*, *Pavlova* sp., *Diacronema* sp., *Synechococcus* sp., *Glossomastix* sp. et *Phaeodactylum tricornutum*. De plus, l'EPS issu de *Porphyridium cruentum* a été utilisé comme EPS modèle de ces travaux.

Les principaux objectifs de cette thèse étaient d'obtenir des polysaccharides de faibles poids moléculaires à partir d'EPS de microalgues de haut poids moléculaire en utilisant une hydrolyse acide supportée et d'évaluer leurs potentiels anti-âge.

Nos travaux ont permis de :

- **Développer** une **méthode de dépolymérisation** qui associe un prétraitement par haute pression et une hydrolyse acide supportée à l'aide d'une résine cationique forte réalisée soit dans un système batch soit dans un montage circulaire fermé,
- **Caractériser ces polysaccharides** d'un point de vue biochimique afin d'accroître les connaissances générales sur les EPS de microalgues et potentiellement mettre en évidence des relations structures-fonctions,
- **Identifier** des **activités biologiques** rassemblées dans une approche dermo-cosmétique afin de lutter contre le vieillissement cutané.

Dans un premier temps, la partie 1 des résultats a porté sur **la dépolymérisation des EPS par une hydrolyse acide supportée** afin d'obtenir des polysaccharides de faibles poids moléculaire. Des études réalisées sur l'EPS issu de *Porphyridium cruentum* ont permis de mettre en évidence que la résine cationique qui permet de le dépolymériser est l'**Amberlyst 15**, et que le temps nécessaire pour atteindre une masse moléculaire moyenne de **50 kDa** est de **72**

h. Au vu de cela, un prétraitement par haute pression a été envisagé afin de réduire le temps de réaction. Les hydrolyses acides supportées dans le système batch sur les 6 EPS du projet sous formes natives et PTHP ont permis de **conclure que le prétraitement par haute pression était indispensable pour cette méthode de dépolymérisation**. En effet, il permet de réduire le temps d'hydrolyse et s'est avéré nécessaire pour réduire la masse moléculaire moyenne de l'EPS issu de *Pavlova* sp.. A ce stade de ces résultats, les masses moyennes moléculaires ont été déterminées par une méthode associant une séparation par gel-perméation, une détection RID et à l'aide d'une calibration de pullulanes. Cette méthode ne donnant que des approximations lorsque les polymères d'intérêts ne sont pas dans les mêmes conformations que les standards, un temps commun de **48 h pour les 7 EPS de cette étude** dans un système **batch a été fixé**. Un système d'hydrolyse acide supportée **circulaire fermé à lit fixe** a aussi été mis au point afin d'accroître le transfert de cette méthode à échelle industrielle. Le temps de dépolymérisation a été déterminé à **72 h** après une étude avec l'EPS PTHP issu de *Porphyridium cruentum*.

Dans un second temps, la partie 1 des résultats a été de caractériser les différentes formes de ces EPS d'un point de vue biochimique. Les **EPS natifs** contiennent entre **9 % et 18 % de groupements sulfates** mais après les hydrolyses acides supportés ces taux chutent entre **0 % et 1 %**. L'étude des protéines a mis en évidence que les formes initiales de **ces EPS** sont formées de **3 % à 25 % de protéines** mais que cette teneur diminue avec le procédé de dépolymérisation. Les **pourcentages d'acides uroniques** des formes natives sont compris entre **4 % et 9 %** et les **dépolymérisations** permettent de les **conserver**. En terme de masses moyennes, les EPS natifs, DPB et DPC ont été analysés par triple détection. Cette dernière a montré que les **EPS natifs** sont des **polymères de très haut poids moléculaire** compris entre **1800 kDa et 9500 kDa**. La triple détection a permis de confirmer l'**efficacité du procédé de dépolymérisation** que nous avons développé. Les disparités de masses obtenues entre les deux méthodes d'analyse ont confirmé que la méthode SEC-RID ne donne que des estimations lorsque les étalons et les polymères d'intérêts ne sont pas dans les mêmes conformations.

La partie 2 des résultats & discussion s'est intéressée à l'évaluation de l'activité dermo-cosmétique des EPS de ce projet avec l'évaluation de leurs potentiels anti-âge pour cibler le vieillissement cutané.

Dans un premier temps, les effets des EPS sur les synthèses de **collagène** et d'**acide hyaluronique** par deux modèles de **fibroblastes dermiques humains** issus de **femmes de 20 ans et 46 ans** ont été évalués. Le choix de prendre deux lignées cellulaires issues de femmes

d'âges différents a permis de cibler deux panels de consommateurs dont les cellules sont métaboliquement différentes. Les différents EPS ont été testés à une concentration de **100 µg/ml**. Une étude préliminaire a démontré que les **EPS diminuent la viabilité cellulaire** des fibroblastes **sans changer la morphologie** des cellules. Une exception est l'EPS natif issu de *Chrysothila dentata* qui modifie leurs formes. Au vu de ces résultats et des données présentes dans la littérature (Mast et al., 1993), **deux hypothèses** ont alors été émises. La première était que les EPS ont diminué la viabilité cellulaire en induisant la mort des fibroblastes dermiques humains. La seconde était que les cellules s'orientaient vers la synthèse de macromolécules du derme. Des expériences montrant les effets des EPS sur la mortalité cellulaire, par le dosage de la LDH, ont alors montré que seul l'EPS natif issu de *Chrysothila dentata* était cytotoxique. **Tous les EPS, sauf la forme native de celui issu de *Chrysothila dentata*, ont donc pu faire l'objet des études sur les productions de collagène et d'acide hyaluronique par les deux lignées de fibroblastes.**

Le dosage de collagène *in vitro* a permis de montrer que les **productions de collagène par les deux lignées cellulaires sont stimulées par nos 7 EPS** testés à une concentration de **100 µg/ml**. Ceci permet donc d'envisager que nos EPS pourraient retarder l'apparition et/ou réduire les rides. Les réponses induites par nos EPS sont identiques ou supérieures au témoin positif, l'acide hyaluronique, mais testé à une concentration de 1000 µg/ml. Les **augmentations de collagène** provoquées par **nos EPS** sont comprises entre **70 %** et **400 %**. Les réponses cellulaires sont en général plus importantes pour le modèle issu d'une femme de 46 ans. Au niveau des EPS dépolymérisés, les fragments générés par les deux systèmes (batch et circulaire fermé) exercent des effets différents. Par exemple, l'**EPS DPB** issu de *Synechococcus sp.* augmente de **300 %** la production de collagène des **fibroblastes 1090** alors que l'**EPS DPC** la stimule de **150 %**. Les 4 EPS les plus intéressants pour cette activité biologique sont ceux issus des microalgues *Glossomastix sp.*, *Diacronema sp.*, *Synechococcus sp.* et *Porphyridium cruentum*. Ces augmentations de collagènes produits par les fibroblastes induites par les EPS appuient donc **l'hypothèse de l'orientation métabolique des cellules vers la synthèse de macromolécules du derme**. Pour expliquer ces activités, les données collectées dans la littérature scientifique ont permis d'émettre les hypothèses que nos EPS pourraient stimuler la synthèse de collagène en activant **la voie du TGF-β associé aux protéines SMADs** qui est déjà connue pour être activée par l'acide hyaluronique (**Figure 69**).

Les effets des différentes formes des EPS sur la sécrétion d'AH ont également été étudiés sur les mêmes modèles cellulaires. Le témoin positif de cette étude a été le **TGF-β1** testé à une

concentration de **0,01 µg/ml** et il augmente de **40 %** et **30 %** les sécrétions d'AH par les cellules **1059** et **1090**. Les résultats obtenus sont que nos **7 EPS augmentent la synthèse d'AH** par les deux lignées cellulaires avec des réponses plus marquées sur le modèle issu d'une femme de 46 ans. Les formes dépolymérisées des EPS sont en général les plus active. Par exemple, les formes natives et PTHP de l'**EPS issu de *Phaeodactylum tricornutum*** n'ont aucun effet alors que les EPS **DPB** et **DPC** augmentent respectivement de **140 %** et **230 %** les sécrétions d'AH par les cellules 1090. Pour cette activité, les 5 EPS les plus actifs sont issus des microalgues de ***Diacronema sp.*, *Glossomastix sp.*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Synechococcus sp.* et *Porphyridium cruentum***. Les hypothèses émises pour expliquer ces effets sont **soit une activation des enzymes synthétisant l'AH comme la hyaluronase 2 soit une inhibition de sa dégradation par l'intermédiaire des hyaluronidases**. Un **effet antioxydant des EPS** peut aussi être une explication car les ROS sont connus pour dégrader l'AH (**Figure 70**).

Une **analyse en composante principale** pour ces deux activités biologiques a été réalisée avec les éléments structuraux actuellement disponibles, et a mis en avant une corrélation de ces activités biologiques avec le **pourcentage d'acides uroniques**.

Dans un second temps, l'inhibition de la dégradation de ces macromolécules du derme a été étudiée.

Pour cela des études cinétiques ont été réalisées à l'aide d'une MMP-1 humaine et une **HYAL de type I bovine**. Les EPS ainsi que le témoin positif, l'héparine, sont testés à une concentration de **100 µg/ml**. Les **EPS natifs** principalement montrent un **potentiel inhibiteur de la MMP-1** avec des pourcentages d'inhibition compris entre **15 %** et **27 %**. Les effets sont réduits avec la dépolymérisation des EPS sauf pour ceux issus de *Pavlova sp.* et *Glossomastix sp.*. Par exemple, pour l'EPS issu de *Pavlova sp.* les pourcentages d'inhibitions sont de **15 %** avec la **forme native** et de **20 %** avec l'EPS **DPC**.

Une **analyse en composante principale** pour cette inhibition de la MMP-1 a permis de mettre en évidence la corrélation avec **les groupements sulfates**. Le peu de données présentes dans la littérature a confirmé l'ACP et a permis d'émettre l'hypothèse que **cette inhibition serait médiée par les groupements sulfates et/ou les acides uroniques (Figure 69)**.

Concernant **l'inhibition de la dégradation de l'AH par la HYAL**, tous les EPS n'ont pas la capacité d'inhiber cette enzyme. Par exemple, l'EPS issu de *Porphyridium cruentum* n'induit pas d'inhibition de cette enzyme contrairement aux EPS issus de *Pavlova sp.* et de *Diacronema*

sp. Ces **EPS natifs** provoquent une inhibition de **90 %** tout comme l'héparine mais ces pourcentages diminuent à **20 %** avec **les formes dépolymérisées**.

L'ACP a mis une corrélation avec les **masses moyennes en nombre** mais la représentation des individus n'a pas permis de dissocier des groupes d'individus. Dans la littérature le potentiel inhibiteur des polysaccharides est principalement médié par les **groupements sulfates** mais **dans notre étude cela ne se vérifiaient pas**. Ceci laisse donc supposer que d'autres éléments structuraux interviennent comme par exemple, l'emplacement des groupements sulfates dans la structure du polysaccharide (**Figure 70**).

Pour terminer les résultats & discussion de cette thèse, des études préliminaires pour comprendre les mécanismes moléculaires de certains EPS DPB ont été présentées. Ces premiers résultats portent sur des gènes impliqués dans la synthèse ou la dégradation du collagène. Les **EPS DPB** choisis sont issus des microalgues *Glossomastix sp.* et *Synechococcus sp.*. Seules des données sur le modèle issu d'une **femme de 20 ans** ont été présentées. Cette prémisse a permis de mettre en avant que l'**EPS DPB** issu de *Glossomastix sp.* induirait des surexpressions des gènes impliqués dans la synthèse de collagène comme le récepteur 2 du TGF- β et une protéine SMAD 4. De plus, il agirait sur la dégradation du collagène en inhibant l'expression de la MMP-3. L'**EPS DPB de Synechococcus sp.** activerait lui aussi une surexpression du récepteur 2 du TGF- β mais n'aurait pas d'effet sur la dégradation du collagène (**Figure 68**).

Perspectives

A ce stade du projet, nous avons mis au point, à l'échelle laboratoire, une méthode de dépolymérisation qui a permis de réduire la masse moléculaire de l'ensemble des EPS de microalgues de notre étude. Nous avons également mis en évidence des activités anti-âges et amincissantes des EPS pour le domaine de la dermo-cosmétique.

La majorité des résultats présentée dans cette étude a été valorisée par le dépôt d'une déclaration d'invention et a permis de mettre en évidence le fort potentiel des EPS de microalgues et notamment ceux issus de *Glossomastix sp.*. Une des perspectives est de monter à une échelle pilote la culture de cette microalgue afin de produire des quantités plus importante d'EPS. Cela pourrait être réalisé par des partenaires de ce projet comme le laboratoire GEPEA de Saint Nazaire et/ou l'entreprise Algosource Technologies.

Conclusion générale & Perspectives

Les systèmes de dépolymérisation ont été développés à une échelle laboratoire en produisant environ 50 mg par expérience. La suite de cette partie est, là aussi, de développer ces méthodes à une échelle pilote afin d'accroître les biomasses produites.

Les activités dermo-cosmétiques mises en évidence ont été réalisées sur des modèles de fibroblastes dermiques humains pour la partie ciblant le vieillissement cutané. A ce stade du projet, l'une des perspectives serait d'intégrer les actifs ayant les meilleures activités dans des formulations dermo-cosmétiques et de les tester soit sur des modèles de peaux en 3 dimensions (Reisinger et al., 2018) soit directement sur un panel de volontaires sains dans le cadre d'un essai clinique. Toutes ces perspectives énoncées pourraient alors faire l'objet d'un projet de maturation en relation avec la déclaration d'invention déposée.

Afin d'accroître les connaissances générales des EPS issus de microalgues dans le domaine de la dermo-cosmétique, l'étude des mécanismes d'action présentée pourrait être également poursuivie d'une part sur le modèle cellulaire issu d'une femme de 46 ans et d'autre part en élargissant les cibles vers la compréhension de la sécrétion d'acide hyaluronique. Les macromolécules étudiées étaient le collagène et l'acide hyaluronique mais l'élastine tient aussi un rôle important dans le maintien de l'élasticité de la peau et des études menées sur sa synthèse et sa dégradation pourraient être une nouvelle voie de recherche pour compléter ces données.

***Références
bibliographiques***

- A -

Achour, O., Bridiau, N., Godhbani, A., Le Joubioux, F., Bordenave Juchereau, S., Sannier, F., Piot, J.-M., Fruitier Arnaudin, I., and Maugard, T. (2013). Ultrasonic-assisted preparation of a low molecular weight heparin (LMWH) with anticoagulant activity. *Carbohydr. Polym.* *97*, 684–689.

Adrien, A., Bonnet, A., Dufour, D., Baudouin, S., Maugard, T., and Bridiau, N. (2017). Pilot production of ulvans from *Ulva* sp. and their effects on hyaluronan and collagen production in cultured dermal fibroblasts. *Carbohydr. Polym.* *157*, 1306–1314.

Agarwal, S., and Krishnamurthy, K. (2019). Histology, Skin. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Aida, T.M., Yamagata, T., Watanabe, M., and Smith, R.L. (2010). Depolymerization of sodium alginate under hydrothermal conditions. *Carbohydr. Polym.* *80*, 296–302.

Alam, M.M., Maniruzzaman, M., and Morshed, M.M. (2014). 7.10 - Application and Advances in Microprocessing of Natural Fiber (Jute)–Based Composites. In *Comprehensive Materials Processing*, (Oxford: Elsevier), pp. 243–260.

Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W., and Harley, C.B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 10114–10118.

Arad, S. (Malis), and Levy-Ontman, O. (2010). Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.* *21*, 358–364.

Arda, O., Göksüğü, N., and Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin. Dermatol.* *32*, 3–13.

Ardhan, N., Ruttithiwapanich, T., Songkasiri, W., and Phalakornkule, C. (2015). Comparison of performance of continuous-flow and batch electrocoagulators: A case study for eliminating reactive blue 21 using iron electrodes. *Sep. Purif. Technol.* *146*, 75–84.

Ariede, M.B., Candido, T.M., Jacome, A.L.M., Velasco, M.V.R., de Carvalho, J.C.M., and Baby, A.R. (2017). Cosmetic attributes of algae - A review. *Algal Res.* *25*, 483–487.

Asada, M., Sugie, M., Inoue, M., Nakagomi, K., Hongo, S., Murata, K., Irie, S., Takeuchi, T., Tomizuka, N., and Oka, S. (1997). Inhibitory Effect of Alginic Acids on Hyaluronidase and on Histamine Release from Mast Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *61*, 1030–1032.

Atrous, H., Benbettaieb, N., Hosni, F., Danthine, S., Blecker, C., Attia, H., and Ghorbel, D. (2015). Effect of γ -radiation on free radicals formation, structural changes and functional properties of wheat starch. *Int. J. Biol. Macromol.* *80*, 64–76.

- B -

- Baudelet, P-H., Ricochon, G., Linder, M., Muniglia, L. (2017). A new insight into cell walls of *Chlorophyta*. *Algal Research*. 25, 333-371
- Becker, E.W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25, 207–210.
- Bensaleh, H., Belgnaoui, F.Z., Douira, L., Berbiche, L., Senouci, K., and Hassam, B. (2008). Peau et ménopause. *Ann. Endocrinol.* 67, 575–580.
- Bernaerts, T.M.M., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M.E., and Van Loey, A.M. (2019). The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. *Biotechnol. Adv.* 107419.
- Beylot, C. (2009). Vieillesse cutané : aspects cliniques, histologiques et physiopathologiques. *Ann. Dermatol. Vénérologie* 136, 263–269.
- Bleakley, S., and Hayes, M. (2017). Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods* 6.
- Blumenkrantz, N., and Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54, 484–489.
- Blumreisinger, M., Meindl, D., and Loos, E. (1983). Cell wall composition of chlorococcal algae. *Phytochemistry* 22, 1603–1604.
- Boisnic, S., and Branchet, M.-C. (2005). Vieillesse cutané chronologique. *EMC - Dermatol.-Cosmétologie* 2, 232–241.
- Borowitzka, M.A., and Moheimani, N.R. (2013). Algae for Biofuels and Energy.
- Bouloc, A. (2001). Les cellules dendritiques cutanées humaines. *MS Médecine Sci.* 17, 465–474.
- Bourboulia, D., and Stetler-Stevenson, W.G. (2010). Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin. Cancer Biol.* 20, 161–168.
- Brandner, J.M., Zorn-Kruppa, M., Yoshida, T., Moll, I., Beck, L.A., and Benedetto, A.D. (2015). Epidermal tight junctions in health and disease. *Tissue Barriers* 3, e974451.
- Burana-osot, J., Hosoyama, S., Nagamoto, Y., Suzuki, S., Linhardt, R.J., and Toida, T. (2009). Photolytic depolymerization of alginate. *Carbohydr. Res.* 344, 2023–2027.

- C -

Campo, G.M., Avenoso, A., Campo, S., D'Ascola, A., Ferlazzo, A.M., and Calatroni, A. (2007). Differential effect of growth factors on hyaluronan synthase gene expression in fibroblasts exposed to oxidative stress. *Biochem. Mosc.* 72, 974–982.

Cavinato, C., Ugurlu, A., de Godos, I., Kendir, E., and Gonzalez-Fernandez, C. (2017). 7 - Biogas production from microalgae. In *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, C. Gonzalez-Fernandez, and R. Muñoz, eds. (Woodhead Publishing), pp. 155–182.

Chanda, M., Merghoub, N., and EL Arroussi, H. (2019). Microalgae polysaccharides: the new sustainable bioactive products for the development of plant bio-stimulants? *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35, 177.

Chen, K. C., Ogden, K. L., (2011) Algal biofuels: The research. *Chemical and Environmental engineering* 107, 42-47.

Chen, S., Li, G., Wu, N., Guo, X., Liao, N., Ye, X., Liu, D., Xue, C., and Chai, W. (2013). Sulfation pattern of the fucose branch is important for the anticoagulant and antithrombotic activities of fucosylated chondroitin sulfates. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3054–3066.

Chen, X., Song, L., Wang, H., Liu, S., Yu, H., Wang, X., Li, R., Liu, T., and Li, P. (2019). Partial characterization, the immune modulation and anticancer activities of sulfated polysaccharides from filamentous microalgae *Tribonema* sp. *Molecules* 24.

Chen, Z., Wang, L., and Ge, S. (2018). Determination of Microalgal Lipid Content and Fatty Acid for Biofuel Production. *BioMed Res. Int.* 17.

Clayton, K., Vallejo, A.F., Davies, J., Sirvent, S., and Polak, M.E. (2017). Langerhans Cells—Programmed by the Epidermis. *Front. Immunol.* 8.

Cohen, A. (Katz), and Arad, S. (Malis) (1998). Biosynthesis of the Cell Wall Polysaccharide in the Red Microalga *Rhodella Reticulata*. *Isr. J. Plant Sci.* 46, 147–153.

Contesini, F.J., de Alencar Figueira, J., Kawaguti, H.Y., de Barros Fernandes, P.C., de Oliveira Carvalho, P., Nascimento, M. da G., and Sato, H.H. (2013). Potential Applications of Carbohydrases Immobilization in the Food Industry. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 1335–1369.

Costa, J.A.V., Freitas, B.C.B., Cruz, C.G., Silveira, J., and Morais, M.G. (2019). Potential of microalgae as biopesticides to contribute to sustainable agriculture and environmental development. *J. Environ. Sci. Health Part B* 54, 366–375.

Costa, L.S., Fidelis, G.P., Cordeiro, S.L., Oliveira, R.M., Sabry, D.A., Câmara, R.B.G., Nobre, L.T.D.B., Costa, M.S.S.P., Almeida-Lima, J., Farias, E.H.C., et al. (2010). Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomed. Pharmacother.* 64, 21–28.

- D -

Dai, B., Wei, D., Zheng, N., Chi, Z., Xin, N., Ma, T., Zheng, L., Sumi, R., and Sun, L. (2018). *Coccomyxa Gloeobotrydiformis* Polysaccharide Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in RAW 264.7 Macrophages. *Cell. Physiol. Biochem.* 51, 2523–2535.

D'Alessandro, E.B., and Antoniosi Filho, N.R. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 58, 832–841.

Danielson, K.G., Baribault, H., Holmes, D.F., Graham, H., Kadler, K.E., and Iozzo, R.V. (1997). Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J. Cell Biol.* 136, 729–743.

Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Michaud, P. (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances.* 34, 1159-1179.

Démarchez, M. (2019). Le mélanocyte et la pigmentation.

Diaz Bayona, K.C., Navarro G, S.M., Lara E, A.D., Colorado R, J., Atehortua G, L., and Martinez M, A. (2012). ACTIVITY of SULFATED POLYSACCHARIDES from MICROALGAE *Porphyridium cruentum* over DEGENERATIVE MECHANISMS of the SKIN. *Int. J. Sci. Adv. Technol.* 2, 85–92.

Dixit, R.B., and Suseela, M.R. (2013). Cyanobacteria: potential candidates for drug discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103, 947–961.

Dogra, B., Amna, S., Park, Y.I., and Park, J.K. (2017). Biochemical properties of water soluble polysaccharides from photosynthetic marine microalgae *Tetraselmis* species. *Macromol. Res.* 25, 172–179.

Donejko, M., Przyłipiak, A., Rysiak, E., Miltyk, W., Galicka, E., Przyłipiak, J., Zaręba, I., and Surazynski, A. (2015). Hyaluronic acid abrogates ethanol-dependent inhibition of collagen biosynthesis in cultured human fibroblasts. *Drug Des. Devel. Ther.* 9, 6225–6233.

Dosuna-Rodríguez, I., and Gaigneaux, E.M. (2012). Glycerol acetylation catalysed by ion exchange resins. *Catal. Today* 195, 14–21.

Dréno, B. (2009). Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes. *Ann. Dermatol. Vénéréologie* 136, S247–S251.

Dvir, I., Chayoth, R., Sod-Moriah, U., Shany, S., Nyska, A., Stark, A.H., Madar, Z., and Arad, S.M. (2000). Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *Porphyridium* sp. alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats. *Br. J. Nutr.* 84, 469–476.

Dvir, I., Stark, A.H., Chayoth, R., Madar, Z., and Arad, S.M. (2009). Hypocholesterolemic Effects of Nutraceuticals Produced from the Red Microalga *Porphyridium* sp in Rats. *Nutrients* 1, 156–167.

- F -

Falaise, C., François, C., Travers, M.-A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., et al. (2016). Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. *Mar. Drugs* *14*.

Farid, R., Mutale-joan, C., Redouane, B., Mernissi Najib, E., Abderahime, A., Laila, S., and Arroussi Hicham, E. (2018). Effect of Microalgae Polysaccharides on Biochemical and Metabolomics Pathways Related to Plant Defense in *Solanum lycopersicum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*

Filisetti-Cozzi, T.M., and Carpita, N.C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Biochem.* *197*, 157–162.

Fisher, G.J., Shao, Y., He, T., Qin, Z., Perry, D., Voorhees, J.J., and Quan, T. (2016). Reduction of fibroblast size/mechanical force down-regulates TGF- β type II receptor: implications for human skin aging. *Aging Cell* *15*, 67–76.

Flórez-Fernández, N., Torres, M.D., González-Muñoz, M.J., and Domínguez, H. (2018). Potential of intensification techniques for the extraction and depolymerization of fucoidan. *Algal Res.* *30*, 128–148.

Floury, J., Desrumaux, A., Axelos, M.A.V., and Legrand, J. (2002). Degradation of methylcellulose during ultra-high pressure homogenisation. *Food Hydrocoll.* *16*, 47–53.

Franchi, J., Pellicier, F., André, P., and Schnebert, S. (2003). L'adipocyte dans une histoire d'aminocissant. *Pathol. Biol.* *51*, 244–247.

Frija, L.M.T., and Afonso, C.A.M. (2012). Amberlyst®-15: a reusable heterogeneous catalyst for the dehydration of tertiary alcohols. *Tetrahedron* *68*, 7414–7421.

Fryer, H.J.L., Davis, G.E., Manthorpe, M., and Varon, S. (1986). Lowry protein assay using an automatic microtiter plate spectrophotometer. *Anal. Biochem.* *153*, 262–266.

- G -

Gaignard, C. (2019). Criblage, identification et caractérisations physico-chimiques d'exopolysaccharides de microalgues et Cyanobactéries. Spécialité: Microbiologie et Biochimie.

Gall, Y. (2010). Acide hyaluronique: structure, métabolisme et implication dans la cicatrisation. *Ann. Dermatol. Vénérologie* *137*, S30–S39.

Gangl, D., Zedler, J.A.Z., Rajakumar, P.D., Martinez, E.M.R., Riseley, A., Włodarczyk, A., Purton, S., Sakuragi, Y., Howe, C.J., Jensen, P.E., et al. (2015). Biotechnological exploitation of microalgae. *J. Exp. Bot.* *66*, 6975–6990.

Gardeva, E., Toshkova, R., Minkova, K., and Gigova, L. (2009). Cancer Protective Action of Polysaccharide, Derived from Red Microalga *Porphyridium Cruentum*—A Biological Background. *Biotechnol. Equip.* *23*, 783–787.

- Geresh, S., and Arad, S. (1991). The extracellular polysaccharides of the red microalgae: Chemistry and rheology. *Bioresour. Technol.* 38, 195–201.
- Geresh, S., Adin, I., Yarmolinsky, E., and Karpasas, M. (2002). Characterization of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: molecular weight determination and rheological properties. *Carbohydr. Polym.* 50, 183–189.
- Girish, K.S., and Kemparaju, K. (2005). Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides. - PubMed - NCBI.
- Girish, K.S., and Kemparaju, K. (2007). The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* 80, 1921–1943.
- Girish, K.S., Kemparaju, K., Nagaraju, S., and Vishwanath, B.S. (2009). Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic perspective. *Curr. Med. Chem.* 16, 2261–2288.
- Gladyshev, V.N. (2014). The Free Radical Theory of Aging Is Dead. Long Live the Damage Theory! *Antioxid. Redox Signal.* 20, 727–731.
- Gloaguen, V., Ruiz, G., Morvan, H., Mouradi-Givernaud, A., Maes, E., Krausz, P., and Strecker, G. (2004). The extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: an NMR study of lithium-resistant oligosaccharidic fragments. *Carbohydr. Res.* 339, 97–103.
- Górska-Frączek, S., Sandström, C., Kenne, L., Paściak, M., Brzozowska, E., Strus, M., Heczko, P., and Gamian, A. (2013). The structure and immunoreactivity of exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus johnsonii* strain 151. *Carbohydr. Res.* 378, 148–153.
- Gralén, N., and Svedberg, T. (1943). Molecular Weight of Native Cellulose. *Nature* 152, 625–625.
- Grether-Beck, S., Olaizola-Horn, S., Schmitt, H., Grewe, M., Jahnke, A., Johnson, J.P., Briviba, K., Sies, H., and Krutmann, J. (1996). Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14586–14591.
- Guzmán, S., Gato, A., Lamela, M., Freire-Garabal, M., and Calleja, J.M. (2003). Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytother. Res.* 17, 665–670.

- H -

- Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458–460.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Hayakawa, Y., Hayashi, T., Hayashi, K., Hayashi, T., Ozawa, T., Niiya, K., and Sakuragawa, N. (1996). Heparin cofactor II-dependent antithrombin activity of calcium spirulan. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 7, 554–560.

- Hayakawa, Y., Hayashi, T., Hayashi, K., Ozawa, T., Niiya, K., and Sakuragawa, N. (1997). Calcium spirulan as an inducer of tissue-type plasminogen activator in human fetal lung fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1355, 241–247.
- Hayakawa, Y., Hayashi, T., Lee, J.-B., Ozawa, T., and Sakuragawa, N. (2000). Activation of Heparin Cofactor II by Calcium Spirulan. *J. Biol. Chem.* 275, 11379–11382.
- Hayflick, L. (1965). The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614–636.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621.
- He, K., Mergens, B., Yacilla, M., Zheng, Q., Bao, Z., Zhang, Y., Li, X., and Xie, Z. (2018). Molecular Weight Determination of Aloe Polysaccharides Using Size Exclusion Chromatography Coupled with Multi-Angle Laser Light Scattering and Refractive Index Detectors. *J. AOAC Int.* 101, 1729–1740.
- He, P., Zhang, A., Zhang, F., Linhardt, R.J., and Sun, P. (2016). Structure and bioactivity of a polysaccharide containing uronic acid from *Polyporus umbellatus* sclerotia. *Carbohydr. Polym.* 152, 222–230.
- Heaney-Kieras, J., and J. Chapman, D. (1976). Structural studies on the extracellular polysaccharide of the red alga, *Porphyridium cruentum*. *Carbohydr. Res.* 52, 169–177.
- Heinze, T., and Liebert, T. (2001). Unconventional methods in cellulose functionalization. *Prog. Polym. Sci.* 26, 1689–1762.
- Holme, H.K., Lindmo, K., Kristiansen, A., and Smidsrød, O. (2003). Thermal depolymerization of alginate in the solid state. *Carbohydr. Polym.* 54, 431–438.
- Honglei, Z. (2016). Preparation and Characterization of a Sulfonated Carbonbased Solid Acid Microspheric Material (SCSAM) and its use for the Esterification of Oleic Acid with Methanol.
- Horn, S.J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., and Eijsink, V.G. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol. Biofuels* 5, 45.
- Hu, J.-L., Nie, S.-P., and Xie, M.-Y. (2013). High pressure homogenization increases antioxidant capacity and short-chain fatty acid yield of polysaccharide from seeds of *Plantago asiatica* L. *Food Chem.* 138, 2338–2345.
- Huheihel, M., Ishanu, V., Tal, J., and Arad, S.M. (2002). Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses *in vitro* and *in vivo*. *J. Biochem. Biophys. Methods* 50, 189–200.
- Huleihel, M., Ishanu, V., Tal, J., and Arad, S. (Malis) (2001). Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on *Herpes simplex* and *Varicella zoster* viruses. *J. Appl. Phycol.* 13, 127–134.
- Hulmes, D.J.S. (2008). Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In *Collagen: Structure and Mechanics*, P. Fratzl, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 15–47.

- I -

Ida-Yonemochi, H. (2013). Role of perlecan, a basement membrane-type heparan sulfate proteoglycan, in enamel organ morphogenesis. *J. Oral Biosci.* *55*, 23–28.

Ignotz, R.A., and Massagué, J. (1986). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* *261*, 4337–4345.

Iskalieva, A., Yimmou, B.M., Gogate, P.R., Horvath, M., Horvath, P.G., and Csoka, L. (2012). Cavitation assisted delignification of wheat straw: A review. *Ultrason. Sonochem.* *19*, 984–993.

Isoyama, T., Thwaites, D., Selzer, M.G., Carey, R.I., Barbucci, R., and Lokeshwar, V.B. (2006). Differential selectivity of hyaluronidase inhibitors toward acidic and basic hyaluronidases. *Glycobiology* *16*, 11–21.

Iyer, S., Visse, R., Nagase, H., and Acharya, K.R. (2006). Crystal Structure of an Active Form of Human MMP-1. *J. Mol. Biol.* *362*, 78–88.

- J -

Jabłońska-Trypuć, A., Matejczyk, M., and Rosochacki, S. (2016). Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* *31*, 177–183.

de Jaeger, C., and Cherin, P. (2012). Matrice extracellulaire, physiologie et vieillissement vasculaire. *Médecine Longévité* *4*, 41–53.

Jaques, L.B., Balueux, R.E., Dietrich, C.P., and Kavanagh, L.W. (1968). A microelectrophoresis method for heparin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *46*, 351–360.

Jauregui, H.O., Hayner, N.T., Driscoll, J.L., Williams-Holland, R., Lipsky, M.H., and Galletti, P.M. (1981). Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes—Freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures. *In Vitro* *17*, 1100–1110.

Jayappriyan, K.R., Rajkumar, R., Venkatakrishnan, V., Nagaraj, S., and Rengasamy, R. (2013). In vitro anticancer activity of natural β -carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 cells. *Biomed. Prev. Nutr.* *3*, 99–105.

Jenkins, G. (2002). Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech. Ageing Dev.* *123*, 801–810.

de Jesus Raposo, M.F., de Morais, A.M.B., and de Morais, R.M.S.C. (2015). Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. *Mar. Drugs* *13*, 2967–3028.

John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M., and Pandey, A. (2011). Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.* *102*, 186–193.

Junqueira, L.C.U., Bignolas, G., and Brentani, R.R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* *11*, 447–455.

Juráňová, J., Franková, J., and Ulrichová, J. (2017). The role of keratinocytes in inflammation. *J. Appl. Biomed.* *15*, 169–179.

- K -

Kasaai, M.R., Charlet, G., Paquin, P., and Arul, J. (2003). Fragmentation of chitosan by microfluidization process. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* *4*, 403–413.

Kasaai, M.R., Arul, J., and Charlet, G. (2008). Fragmentation of chitosan by ultrasonic irradiation. *Ultrason. Sonochem.* *15*, 1001–1008.

Katurou, M., Sayuri, M., Masaatsu-Koujirou, U., and Klyoshi, S. (1989). Simple and specific assessment of Ca-entry-blocking activities of drugs by measurement of Ca reversal. *J. Pharmacol. Methods* *22*, 265–275.

Kelishomi, Z.H., Goliaei, B., Mahdavi, H., Nikoofar, A., Rahimi, M., Moosavi-Movahedi, A.A., Mamashli, F., and Bigdeli, B. (2016). Antioxidant activity of low molecular weight alginate produced by thermal treatment. *Food Chem.* *196*, 897–902.

Kielty, C.M., Sherratt, M.J., and Shuttleworth, C.A. (2002). Elastic fibres. *J. Cell Sci.* *115*, 2817–2828.

Kitano, M., Yamaguchi, D., Suganuma, S., Nakajima, K., Kato, H., Hayashi, S., and Hara, M. (2009). Adsorption-Enhanced Hydrolysis of β -1,4-Glucan on Graphene-Based Amorphous Carbon Bearing SO₃H, COOH, and OH Groups. *Langmuir* *25*, 5068–5075.

Koide, T., and Nagata, K. (2005). Collagen Biosynthesis. In *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly*, J. Brinckmann, H. Notbohm, and P.K. Müller, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 85–114.

Kroma, A., Feliczak-Guzik, A., and Nowak, I. (2012). The use of glycosaminoglycans in cosmetic products. *Chemik* *66*, 136–139.

Kumar, P., Nagarajan, A., and Uchil, P.D. (2018). Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* *2018*.

Kumari, S., Thng, S.T.G., Verma, N.K., and Gautam, H.K. (2018). Melanogenesis inhibitors. *Acta Derm. Venereol.* *98*, 924–931.

Kusaikin, M.I., Ermakova, S.P., Shevchenko, N.M., Isakov, V.V., Gorshkov, A.G., Vereshchagin, A.L., Grachev, M.A., and Zvyagintseva, T.N. (2010). Structural characteristics and antitumor activity of a new chrysolaminaran from the diatom alga *Synedra acus*. *Chem. Nat. Compd.* *46*, 1–4.

- L -

- Lago, J.C., and Puzzi, M.B. (2019). The effect of aging in primary human dermal fibroblasts. *PLoS ONE* *14*, e0219165.
- Lai-Cheong, J.E., and McGrath, J.A. (2013). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (Baltimore)* *41*, 317–320.
- Lam, M.K., and Lee, K.T. (2015). Chapter 12 - Bioethanol Production from Microalgae. In *Handbook of Marine Microalgae*, S.-K. Kim, ed. (Boston: Academic Press), pp. 197–208.
- Laurienzo, P. (2010). Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: An Overview. *Mar. Drugs* *8*, 2435–2465.
- Le Costaouëc, T., Unamunzaga, C., Mantecon, L., and Helbert, W. (2017). New structural insights into the cell-wall polysaccharide of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Res.* *26*, 172–179.
- Lee, D.H., Oh, J.-H., and Chung, J.H. (2016). Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. *J. Dermatol. Sci.* *83*, 174–181.
- Lee, J.-B., Hayashi, K., Hirata, M., Kuroda, E., Suzuki, E., Kubo, Y., and Hayashi, T. (2006). Antiviral sulfated polysaccharide from *Navicula directa*, a diatom collected from deep-sea water in Toyama Bay. *Biol. Pharm. Bull.* *29*, 2135–2139.
- Lee, J.-E., Guragain, Y.N., Bastola, K.P., and Vadlani, P.V. (2017). Innovative methods to generate clean sugar stream from biomass feedstocks for efficient fermentation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* *40*, 633–641.
- Leite, S.R. de A. (2009). Inhibitors of human collagenase, MMP1. *Eclética Quím.* *34*, 87–102.
- Leroy, F., and De Vuyst, L. (2016). Advances in production and simplified methods for recovery and quantification of exopolysaccharides for applications in food and health1. *J. Dairy Sci.* *99*, 3229–3238.
- Li, B., Lu, F., Wei, X., and Zhao, R. (2008). Fucoidan: structure and bioactivity. *Mol. Basel Switz.* *13*, 1671–1695.
- Liu, L., Pohnert, G., and Wei, D. (2016). Extracellular Metabolites from Industrial Microalgae and Their Biotechnological Potential. *Mar. Drugs* *14*, 191.
- Liu, X., Zhang, M., Zhou, A., Cao, Y., and Liu, X. (2018). Preliminary characterization of the structure and immunostimulatory and anti-aging properties of the polysaccharide fraction of *Haematococcus pluvialis*. *RSC Adv.* *8*, 9243–9252.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* *25*, 402–408.
- Løbner, M., Walsted, A., Larsen, R., Bendtzen, K., and Nielsen, C.H. (2008). Enhancement of Human Adaptive Immune Responses by Administration of a High-Molecular-Weight Polysaccharide Extract from the Cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J. Med. Food* *11*, 313–322.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265–275.

- M -

Ma, X., Xie, B., Du, J., Zhang, A., Hao, J., Wang, S., Wang, J., and Cao, J. (2017). The Anti-Inflammatory Effect and Structure of EPCP1-2 from *Cryptocodinium cohnii* via Modulation of TLR4-NF- κ B Pathways in LPS-Induced RAW 264.7 Cells. *Mar. Drugs* *15*, 376.

Mabrouk, A. (2012). Caractérisation des résines échangeuses d'ions d'intérêt pour les réacteurs à eau sous pression : Application et validation d'un modèle dédié. thesis. Paris, ENMP.

MacArthur, L.A., and D'Appolonia, B.L. (1984). Gamma radiation of wheat. II. Effects of low-dosage radiations on starch properties. *Cereal Chem* *61*, 321–326.

Magin, T.M., Vijayaraj, P., and Leube, R.E. (2007). Structural and regulatory functions of keratins. *Exp. Cell Res.* *313*, 2021–2032.

Maksimenko, A.V., Petrova, M.L., Tischenko, E.G., and Schechilina, Y.V. (2001). Chemical modification of hyaluronidase regulates its inhibition by heparin. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* *51*, 33–38.

Manuskiatti, W., and Maibach, H.I. (1996). Hyaluronic acid and skin: wound healing and aging. *Int. J. Dermatol.* *35*, 539–544.

Markovitz, A., Cifonelli, J.A., and Dorfman, A. (1959). The biosynthesis of hyaluronic acid by group A Streptococcus. VI. Biosynthesis from uridine nucleotides in cell-free extracts. *J. Biol. Chem.* *234*, 2343–2350.

Mast, B.A., Diegelmann, R.F., Krummel, T.M., and Cohen, I.K. (1993). Hyaluronic acid modulates proliferation, collagen and protein synthesis of cultured fetal fibroblasts. *Matrix Stuttg. Ger.* *13*, 441–446.

Mata, T.M., Martins, A.A., and Caetano, Nidia.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* *14*, 217–232.

Matsui, M.S., Muizzuddin, N., Arad, S., and Marenus, K. (2003). Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *104*, 13–22.

Mestechkina, N.M., and Shcherbukhin, V.D. (2010). Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* *46*, 267–273.

Meyer, K., and Palmer, J.W. (1934). The Polysaccharide of the Vitreous Humor. *J. Biol. Chem.* *107*, 629–634.

Mohamed, Z.A. (2008). Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. *Ecotoxicology* *17*, 504–516.

Moll, I., Roessler, M., Brandner, J.M., Eispert, A.-C., Houdek, P., and Moll, R. (2005). Human Merkel cells – aspects of cell biology, distribution and functions. *Eur. J. Cell Biol.* 84, 259–271.

Monfils, A., Triemer, R., and Bellairs, E. (2011). Characterization of paramylon morphological diversity in photosynthetic euglenoids (Euglenales, Euglenophyta). *Phycologia* 50, 156–169.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

Mourelle, M., Gómez, C., Legido, J., Mourelle, M.L., Gómez, C.P., and Legido, J.L. (2017). The Potential Use of Marine Microalgae and Cyanobacteria in Cosmetics and Thalassotherapy. *Cosmetics* 4, 46.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263–273.

- N -

Najdenski, H.M., Gigova, L.G., Iliev, I.I., Pilarski, P.S., Lukavský, J., Tsvetkova, I.V., Ninova, M.S., and Kussovski, V.K. (2013). Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *Int. J. Food Sci. Technol.* 48, 1533–1540.

Nicolaus, B., Panico, A., Lama, L., Romano, I., Manca, M.C., De Giulio, A., and Gambacorta, A. (1999). Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry* 52, 639–647.

Nomura, Y. (2006). Structural Change in Decorin with Skin Aging. *Connect. Tissue Res.* 47, 249–255.

Noonan, D.M., Fulle, A., Valente, P., Cai, S., Horigan, E., Sasaki, M., Yamada, Y., and Hassell, J.R. (1991). The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* 266, 22939–22947.

Nosál'ová, G., Capek, P., Matáková, T., Nosál', S., Flešková, D., and Jureček, E. (2012). Antitussive activity of an extracellular *Rhodella grisea* proteoglycan on the mechanically induced cough reflex. *Carbohydr. Polym.* 87, 752–756.

- O -

Ofman, D., Slim, G.C., Watt, D.K., and Yorke, S.C. (1997). Free radical induced oxidative depolymerisation of chondroitin sulphate and dermatan sulphate. *Carbohydr. Polym.* 33, 47–56.

Oliveira, R., Marques, F., and Azeredo, J. (1999). Purification of polysaccharides from a biofilm matrix by selective precipitation of proteins. *Biotechnol. Tech.* 13, 391–393.

Ortonne, J.P., and Benedetto, J.P. (1981). Mélanocytes épidermiques et mélanocytes folliculaires. *Ann. Génétique Sélection Anim.* *13*, 17–26.

- P -

Papakonstantinou, E., Roth, M., and Karakiulakis, G. (2012). Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol.* *4*, 253–258.

Park, G.-T., Go, R.-E., Lee, H.-M., Lee, G.-A., Kim, C.-W., Seo, J.-W., Hong, W.-K., Choi, K.-C., and Hwang, K.-A. (2017). Potential Anti-proliferative and Immunomodulatory Effects of Marine Microalgal Exopolysaccharide on Various Human Cancer Cells and Lymphocytes In Vitro. *Mar. Biotechnol.* *19*, 136–146.

Park, J.K., Kim, Z.-H., Lee, C.G., Synytsya, A., Jo, H.S., Kim, S.O., Park, J.W., and Park, Y.I. (2011). Characterization and immunostimulating activity of a water-soluble polysaccharide isolated from *Haematococcus lacustris*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* *16*, 1090–1098.

Passeron, T., and Ortonne, J.-P. (2003). Le vieillissement cutané et sa prévention. *Presse Médicale* *32*, 1474–1482.

Patel, A.K., Laroche, C., Marcati, A., Ursu, A.V., Jubeau, S., Marchal, L., Petit, E., Djelveh, G., and Michaud, P. (2013). Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Bioresour. Technol.* *145*, 345–350.

Pękal, A., and Pyrzyńska, K. (2015). Effect of pH and metal ions on DPPH radical scavenging activity of tea. *Int. J. Food Sci. Nutr.* *66*, 58–62.

Percival, E., and Foyle, R.A.J. (1979). The extracellular polysaccharides of *porphyridium cruentum* and *porphyridium aerugineum*. *Carbohydr. Res.* *72*, 165–176.

Peterson, M.J., Czerwinski, S.A., and Siervogel, R.M. (2003). Development and validation of skinfold-thickness prediction equations with a 4-compartment model. *Am. J. Clin. Nutr.* *77*, 1186–1191.

Petit, A.-C., Noiret, N., Guezennec, J., Gondrexon, N., and Collic-Jouault, S. (2007). Ultrasonic depolymerization of an exopolysaccharide produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. *Ultrason. Sonochem.* *14*, 107–112.

Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., and Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *40*, 781–796.

Pisano, C., Aulicino, C., Vesce, L., Casu, B., Naggi, A., Torri, G., Ribatti, D., Belleri, M., Rusnati, M., and Presta, M. (2005). Undersulfated, low-molecular-weight glycol-split heparin as an antiangiogenic VEGF antagonist. *Glycobiology* *15*, 1C-6C.

Pittayapruek, P., Meephansan, J., Prapapan, O., Komine, M., and Ohtsuki, M. (2016). Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.

Porter, R.M., and Birgitte Lane, E. (2003). Phenotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function. *Trends Genet.* *19*, 278–285.

Praillet, C., Grimaud, J.A., and Lortat-Jacob, H. (1998). Les protéoglycanes. (I) Molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques ? *MS Médecine Sci.* *14*, 412–420.

Prajapat, A.L., Subhedar, P.B., and Gogate, P.R. (2016). Ultrasound assisted enzymatic depolymerization of aqueous guar gum solution. *Ultrason. Sonochem.* *29*, 84–92.

Prost-Squarcioni, C. (2006). Histologie de la peau et des follicules pileux. *médecine/sciences* *22*, 131–137.

Prost-squarcioni, C., Fraitag, S., Heller, M., and Boehm, N. (2008). Histologie fonctionnelle du derme. *Ann. Dermatol. Vénérologie* *135*, 5–20.

- Q -

Quan, T., Qin, Z., Xia, W., Shao, Y., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2009). Matrix-degrading Metalloproteinases in Photoaging. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res.* *14*, 20–24.

- R -

Radonić, A., Thulke, S., Achenbach, J., Kurth, A., Vreemann, A., König, T., Walter, C., Possinger, K., and Nitsche, A. (2011). Anionic Polysaccharides From Phototrophic Microorganisms Exhibit Antiviral Activities to Vaccinia Virus. *J. Antivir. Antiretrovir.* *2*, 51–55.

Ramus, J. (1981). The capture and transduction of light energy. *Biol. Seaweeds* 349–464.

Raposo, M.F. de J., de Morais, A.M.M.B., and de Morais, R.M.S.C. (2014). Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Life Sci.* *101*, 56–63.

Rayahin, J.E., Buhrman, J.S., Zhang, Y., Koh, T.J., and Gemeinhart, R.A. (2015). High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation. *ACS Biomater. Sci. Eng.* *1*, 481–493.

Reed, C.C., and Iozzo, R.V. (2002). The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj. J.* *19*, 249–255.

Reisinger, K., Blatz, V., Brinkmann, J., Downs, T.R., Fischer, A., Henkler, F., Hoffmann, S., Krul, C., Liebsch, M., Luch, A., et al. (2018). Validation of the 3D Skin Comet assay using full thickness skin models: Transferability and reproducibility. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* *827*, 27–41.

Richards, H.L., Baker, P.G.L., and Iwuoha, E. (2012). Metal Nanoparticle Modified Polysulfone Membranes for Use in Wastewater Treatment: A Critical Review. *J. Surf. Eng. Mater. Adv. Technol.* 2, 720–726.

Richmond, A. (2008). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (John Wiley & Sons).

Rinaldi, R., Palkovits, R., and Schüth, F. (2008). Depolymerization of Cellulose Using Solid Catalysts in Ionic Liquids. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 8047–8050.

Rinaldi, R., Meine, N., vom Stein, J., Palkovits, R., and Schüth, F. (2010). Which Controls the Depolymerization of Cellulose in Ionic Liquids: The Solid Acid Catalyst or Cellulose? *ChemSusChem* 3, 266–276.

Rollings, J. (1985). Enzymatic depolymerization of polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* 5, 37–82.

Ruggiero, F., Roulet, M., and Bonod-Bidaud, C. (2005). Les collagènes du derme : au-delà de leurs propriétés structurales. *J. Société Biol.* 199, 301–311.

- S -

Sajjadi, B., Chen, W.-Y., Raman, Abdul.Aziz.A., and Ibrahim, S. (2018). Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 97, 200–232.

Santini, O. (2004). *Utilisation des microalgues en aquaculture*. thesis. UM2.

Santoyo, S., Plaza, M., Jaime, L., Ibañez, E., Reglero, G., and Señorans, F.J. (2010). Pressurized Liquid Extraction as an Alternative Process To Obtain Antiviral Agents from the Edible Microalga *Chlorella vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8522–8527.

Santoyo, S., Jaime, L., Plaza, M., Herrero, M., Rodriguez-Meizoso, I., Ibañez, E., and Reglero, G. (2012). Antiviral compounds obtained from microalgae commonly used as carotenoid sources. *J. Appl. Phycol.* 24, 731–741.

Schmierer, B., and Hill, C.S. (2007). TGF β –SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 970–982.

Schultz, G.S., Ladwig, G., and Wysocki, A. (2005). Extracellular matrix: Review of its roles in acute and chronic wounds. *World Wide Wounds* 2005.

Shi, D., Qi, J., Zhang, H., Yang, H., Yang, Y., and Zhao, X. (2019). Comparison of hydrothermal depolymerization and oligosaccharide profile of fucoidan and fucosylated chondroitin sulfate from *Holothuria floridana*. *Int. J. Biol. Macromol.* 132, 738–747.

Shin, J.-W., Kwon, S.-H., Choi, J.-Y., Na, J.-I., Huh, C.-H., Choi, H.-R., and Park, K.-C. (2019). Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2126.

- Shirzad, M., Hamed, J., Motevaseli, E., and Modarressi, M.H. (2018). Anti-elastase and anti-collagenase potential of Lactobacilli exopolysaccharides on human fibroblast. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* *46*, 1051–1061.
- Shrestha, R.P., Weinstein, Y., Bar-Zvi, D., and Arad, S. (M) (2004). A Glycoprotein Noncovalently Associated with Cell-Wall Polysaccharide of the Red Microalga *Porphyridium* Sp. (rhodophyta). *J. Phycol.* *40*, 568–580.
- Sibilla, S., Godfrey, M., Brewer, S., Budh-Raja, A., and Genovese, L. (2015). An Overview of the Beneficial Effects of Hydrolysed Collagen as a Nutraceutical on Skin Properties: Scientific Background and Clinical Studies. *Open Nutraceuticals J.* *8*.
- Sogawa, K., Kodama, E., Matsuda, M., Shigeta, S., and Okutani, K. (1998). Marine microalgal polysaccharide induces apoptosis in human lymphoid cells. *J. Mar. Biotechnol.* *6*, 35–38.
- Sorrell, J.M., Carrino, D.A., Baber, M.A., and Caplan, A.I. (1999). Versican in human fetal skin development. *Anat. Embryol. (Berl.)* *199*, 45–56.
- de Souza, J.F., Lessa, E.F., Nörnberg, A., Gularte, M.S., Quadrado, R.F.N., and Fajardo, A.R. (2018). Enzymatic depolymerization – An easy approach to reduce the chondroitin sulfate molecular weight. *Process Biochem.* *74*, 118–124.
- Stephenson, P.G., Moore, C.M., Terry, M.J., Zubbov, M.V., Bibby, T.S. (2011) Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution. *Trends in Biotechnology.* *29*, 615–623.
- Sun, Y. (2017). Applications of ionizing radiation in materials processing (Warszawa: Institute of Nuclear Chemistry and Technology).
- Sun, L., Wang, C., Shi, Q., and Ma, C. (2009). Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *Int. J. Biol. Macromol.* *45*, 42–47.
- Sun, L., Wang, L., and Zhou, Y. (2012a). Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydr. Polym.* *87*, 1206–1210.
- Sun, L., Wang, L., and Zhou, Y. (2012b). Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydr. Polym.* *87*, 1206–1210.
- Sun, L., Chu, J., Sun, Z., and Chen, L. (2016). Physicochemical properties, immunomodulation and antitumor activities of polysaccharide from *Pavlova viridis*. *Life Sci.* *144*, 156–161.
- Šutovská, M., Kočmálová, M., Pappová, L., Fraňová, S., Chyba, A., Kopecký, J., Lukavský, J., Cepák, V., and Capek, P. (2017). The chemical profile and pharmacodynamic properties of extracellular *Wolleea saccata* biopolymer. *Int. J. Biol. Macromol.* *103*, 863–869.

- T -

- Tachdjian, G., Brisset, S., Courtot, A.-M., Schoëvaërt, D., and Tosca, L. (2016). Peau et annexes cutanées. In *Embryologie et Histologie Humaines*, (Paris: Elsevier Masson), pp. 121–142.
- Tagusagawa, C. (2010). Highly Active Mesoporous Nb–W Oxide Solid-Acid Catalyst.
- Tanimoto, K., Suzuki, A., Ohno, S., Honda, K., Tanaka, N., Doi, T., Yoneno, K., Ohno-Nakahara, M., Nakatani, Y., Ueki, M., et al. (2004). Effects of TGF-beta on hyaluronan anabolism in fibroblasts derived from the synovial membrane of the rabbit temporomandibular joint. *J. Dent. Res.* 83, 40–44.
- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., van-Moppes, D., Grossman, S., and Arad, S. (M) (2005). Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *J. Appl. Phycol.* 17, 215–222.
- Terazawa, S., Nakajima, H., Tobita, K., and Imokawa, G. (2015). The decreased secretion of hyaluronan by older human fibroblasts under physiological conditions is mainly associated with the down-regulated expression of hyaluronan synthases but not with the expression levels of hyaluronidases. *Cytotechnology* 67, 609–620.
- Terpiłowska, S., Siwicka-Gieroba, D., and Siwicki, A.K. (2018). Cell Viability in Normal Fibroblasts and Liver Cancer Cells After Treatment with Iron (III), Nickel (II), and their Mixture. *J. Vet. Res.* 62, 535–542.
- Toida, T., Ogita, Y., Suzuki, A., Toyoda, H., and Imanari, T. (1999). Inhibition of Hyaluronidase by Fully O-Sulfonated Glycosaminoglycans. *Arch. Biochem. Biophys.* 370, 176–182.
- Trabelsi, L., Chaieb, O., Mnari, A., Abid-Essafi, S., and Aleya, L. (2016). Partial characterization and antioxidant and antiproliferative activities of the aqueous extracellular polysaccharides from the thermophilic microalgae *Graesiella* sp. *BMC Complement. Altern. Med.* 16, 210.
- Trincone, A. (2019). *Enzymatic Technologies for Marine Polysaccharides* (CRC Press).
- Trinetta, V., and Cutter, C.N. (2016). Chapter 30 - Pullulan: A Suitable Biopolymer for Antimicrobial Food Packaging Applications. In *Antimicrobial Food Packaging*, J. Barros-Velázquez, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 385–397.
- Tullberg-Reinert, H., and Jundt, G. (1999). In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius Red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor β 2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem. Cell Biol.* 112, 271–276.
- Tzellos, T.G., Sinopidis, X., Kyrgidis, A., Vahtsevanos, K., Triaridis, S., Printza, A., Klagas, I., Karakiulakis, G., and Papakonstantinou, E. (2011). Differential hyaluronan homeostasis and expression of proteoglycans in juvenile and adult human skin. *J. Dermatol. Sci.* 61, 69–72.

- U -

Udabage, L., Brownlee, G.R., Stern, R., and Brown, T.J. (2003). Inhibition of hyaluronan degradation by dextran sulphate facilitates characterisation of hyaluronan synthesis: An *in vitro* and *in vivo* study. *Glycoconj. J.* 20, 461–471.

Umemura, K., Yanase, K., Suzuki, M., Okutani, K., Yamori, T., and Andoh, T. (2003). Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of human cancer cell lines by a marine microalgal polysaccharide. *Biochem. Pharmacol.* 66, 481–487.

- V -

Van Doren, S.R. (2015). Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biol.* 44–46, 224–231.

Vilcoq, L., Castilho, P.C., Carvalheiro, F., and Duarte, L.C. (2014). Hydrolysis of Oligosaccharides Over Solid Acid Catalysts: A Review. *ChemSusChem* 7, 1010–1019.

Villarruel-López, A., Ascencio, F., and Nuño, K. (2017). Microalgae, a Potential Natural Functional Food Source – a Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 67, 251–264.

Vismara, E., Pierini, M., Mascellani, G., Liverani, L., Lima, M., Guerrini, M., and Torri, G. (2010). Low-molecular-weight heparin from Cu²⁺ and Fe²⁺ Fenton type depolymerisation processes. *Thromb. Haemost.* 103, 613–622.

- W -

Wang, F., Garza, L.A., Kang, S., Varani, J., Orringer, J.S., Fisher, G.J., and Voorhees, J.J. (2007). In vivo stimulation of de novo collagen production caused by cross-linked hyaluronic acid dermal filler injections in photodamaged human skin. *Arch. Dermatol.* 143, 155–163.

Wang, F., Zieman, A., and Coulombe, P.A. (2016). Skin Keratins. *Methods Enzymol.* 568, 303–350.

Wang, K., Wang, B., Hu, R., Zhao, X., Li, H., Zhou, G., Song, L., and Wu, A. (2019). Characterization of hemicelluloses in *Phyllostachys edulis* (moso bamboo) culm during xylogenesis. *Carbohydr. Polym.* 221, 127–136.

Wasikiewicz, J.M., Yoshii, F., Nagasawa, N., Wach, R.A., and Mitomo, H. (2005). Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods. *Radiat. Phys. Chem.* 73, 287–295.

Weigel, P.H., Hascall, V.C., and Tammi, M. (1997). Hyaluronan synthases. *J. Biol. Chem.* 272, 13997–14000.

Weiherrmann, A.C., Lorencini, M., Brohem, C.A., and Carvalho, C.M. de (2016). Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *Int. J. Cosmet. Sci.* 39, 241–247.

Wronska, A., and Kmiec, Z. (2012). Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol.* 205, 194–208.

Wu, Y., Fu, Z., Yin, D., Xu, Q., Liu, F., Lu, C., and Mao, L. (2010). Microwave-assisted hydrolysis of crystalline cellulose catalyzed by biomass char sulfonic acids. *Green Chem.* *12*, 696–700.

- X -

Xiao, R., and Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnol. Adv.* *34*, 1225–1244.

- Y -

Yamamoto, C., Nakamura, A., Shimada, S., Kaji, T., Lee, J.-B., and Hayashi, T. (2003). Differential Effects of Sodium Spirulan on the Secretion of Fibrinolytic Proteins from Vascular Endothelial Cells: Enhancement of Plasminogen Activator Activity. *J. Health Sci.* *49*, 405–409.

Yang, O., Prabhu, S., and Ierapetritou, M. (2019a). Comparison between Batch and Continuous Monoclonal Antibody Production and Economic Analysis. *Ind. Eng. Chem. Res.* *58*, 5851–5863.

Yang, S., Wan, H., Wang, R., and Hao, D. (2019b). Sulfated polysaccharides from *Phaeodactylum tricornutum*: isolation, structural characteristics, and inhibiting HepG2 growth activity in vitro. *PeerJ* *7*, e6409.

Ye, F., Kuang, Y., Chen, S., Zhang, C., Chen, Y., and Xing, X.-H. (2009). Characteristics of low molecular weight heparin production by an ultrafiltration membrane bioreactor using maltose binding protein fused heparinase I. *Biochem. Eng. J.* *46*, 193–198.

Yim, J.H., Son, E., Pyo, S., and Lee, H.K. (2005). Novel sulfated polysaccharide derived from red-tide microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03 with immunostimulating activity in vivo. *Mar. Biotechnol.* *7*, 331–338.

Yim, J.H., Kim, S.J., Ahn, S.H., and Lee, H.K. (2007). Characterization of a novel bioflocculant, p-KG03, from a marine dinoflagellate, *Gyrodinium impudicum* KG03. *Bioresour. Technol.* *98*, 361–367.

Yin, L., Morita, A., and Tsuji, T. (2000). Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Arch. Dermatol. Res.* *292*, 188–194.

- Z -

Zanella, L., Pertile, P., Massironi, M., Massironi, M., and Caviola, E. (2014). Extracts of Microalgae and Their Application.

Zhang, J.-M., and An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* *45*, 27–37.

Références bibliographiques

Zhang, M.-F., Qin, Y.-H., Ma, J.-Y., Yang, L., Wu, Z.-K., Wang, T.-L., Wang, W.-G., and Wang, C.-W. (2016). Depolymerization of microcrystalline cellulose by the combination of ultrasound and Fenton reagent. *Ultrason. Sonochem.* *31*, 404–408.

Zhao, X., Yang, B., Li, L., Zhang, F., and Linhardt, R.J. (2013). On-line separation and characterization of hyaluronan oligosaccharides derived from radical depolymerization. *Carbohydr. Polym.* *96*, 503–509.

Evaluation du potentiel anti-âge d'exopolysaccharides issus de microalgues.

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polysaccharides sécrétés par des micro-organismes comme les bactéries et les microalgues. Ces dernières n'ont fait l'objet que de peu d'études contrairement aux autres micro-organismes. Ces travaux s'inscrivent dans le projet ANR POLYSALGUE ayant pour objectifs d'accroître les connaissances actuelles sur les EPS issus de microalgues et de les valoriser. C'est dans ce contexte que les études présentées dans ce manuscrit s'intègrent, et ont pour but de rechercher des activités biologiques à 6 nouveaux EPS dans le domaine de la dermo-cosmétique. La première partie de ces travaux avait pour objectif de mettre au point une méthode de dépolymérisation à l'aide d'une résine cationique, afin de réduire les poids moléculaires de ces polymères. Une fois dépolymérisés, les EPS ont été caractérisés d'un point de vue biochimiques dans le but d'établir une potentielle relation structure-fonction. Pour cela, les poids moléculaires ont été analysés, à la fois par une méthode SEC-RID et par triple détection alliant des détecteurs MALS/RID/VD, et les taux de groupements sulfates, d'acides uroniques et de protéines ont été déterminés. La seconde partie de ces travaux visait à évaluer le potentiel anti-âge des EPS en ciblant le vieillissement cutané. Pour cela, les productions *in vitro* de collagène et d'acide hyaluronique ont été évaluées sur deux modèles de fibroblastes dermiques humains issus de femmes de 20 ans et de 46 ans. Une analyse en composante principale a permis de corrélérer ces productions avec les taux d'acides uroniques. Des études enzymatiques ciblant les inhibitions de métalloprotéases et de hyaluronidases ont aussi été menées. L'inhibition de métalloprotéases semble être corrélée aux taux de groupements sulfates. Pour terminer, une analyse des transcrits a permis de montrer que l'augmentation de collagène produit par les fibroblastes serait due à une activation de la voie du TGF- β 1 et une inhibition de la synthèse de certaines métalloprotéases.

Mots clés : Exopolysaccharides ; Microalgues ; Dépolymérisation par résine cationique ; Vieillesse cutanée ; Collagène ; Acide hyaluronique ; Fibroblastes.

Evaluation of anti-aging potential of exopolysaccharides from microalgae.

Exopolysaccharides (EPS) are polysaccharides produced by microorganisms such as bacteria and microalgae. Unlike other microorganisms, the studies on EPS from microalgae are scarce. The present works takes part of the ANR POLYSALGUE project, which whose purpose is to increase the current knowledge of microalgae EPS and their valorization. In this context, the studies presented in this thesis manuscript aim at investigating biological activities of 6 new EPS from microalgae in the field of cosmetics. The first part of this work consisted in the development of a supported depolymerization method using a cationic resin, in order to reduce the molecular weight of these polymers. After depolymerization, EPS were biochemically characterized analyzing their molecular weight by SEC-RID and MALS/RID/VD methods, and sulfate groups, uronic acids and proteins levels were estimated. The second part was the evaluation of the anti-aging potential of these EPS. For this purpose, *in vitro* productions of collagen and hyaluronic acid were evaluated on cell models of human dermal fibroblasts from 20-years and 46 years old female donors. A principal component analysis unlighted a correlation between this activity and uronic acid levels. Enzymatic kinetics analyses of metalloproteases and hyaluronidases were also conducted, indicating that the inhibition of metalloproteases seemed to be correlated with sulfate groups content of EPS. Finally, an analysis of transcripts showed that the increase in the collagen produced by fibroblast could be due to the activation of the TGF- β 1 signaling pathway and the inhibition of metalloproteases synthesis.

Key words: Exopolysaccharides; Microalgae; Cationic resin depolymerization; Anti-aging; Collagen; Hyaluronic acid; Fibroblasts.

