



**HAL**  
open science

# Approche innovante pour l'ingénierie tissulaire : développement d'un biomatériau à base de collagène réticulé de saumon et de polyphénols bioactifs issus de macrophytes marins

Manon Buscaglia

## ► To cite this version:

Manon Buscaglia. Approche innovante pour l'ingénierie tissulaire : développement d'un biomatériau à base de collagène réticulé de saumon et de polyphénols bioactifs issus de macrophytes marins. Biotechnologies. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2022. Français. NNT : 2022BRES0029 . tel-04213543

**HAL Id: tel-04213543**

**<https://theses.hal.science/tel-04213543v1>**

Submitted on 21 Sep 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.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE  
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

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

Par

**Manon BUSCAGLIA**

**Approche innovante pour l'ingénierie tissulaire : développement d'un biomatériau à base de collagène réticulé de saumon et de polyphénols bioactifs issus de macrophytes marins**

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 09 Mai 2022

Unité de recherche : Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin – LEMAR UMR 6539

## Rapporteurs avant soutenance :

**Concetta M. MESSINA** Professeure associée,  
Université de Palerme

**Benoit CUDENNEC** Maître de conférences,  
Université de Lille

## Composition du Jury :

**Concetta M. MESSINA** Professeure associée, Université de Palerme

**Benoit CUDENNEC** Maître de conférences, Université de Lille

**Laurent PICOT** Maître de conférences, Université de La Rochelle

Présidente du jury :  
**Rozenn LE BERRE** Professeure - Praticienne hospitalière,  
Université de Bretagne Occidentale

Directrice de thèse :  
**Gwenaëlle LE BLAY** Professeure, Université de Bretagne Occidentale

Co-directrice de thèse :  
**Fabienne GUERARD** Professeure, Université de Bretagne Occidentale

Membres invités :  
**Claire HELLIO** Professeure, Université de Bretagne Occidentale

**Valérie STIGER-POUVREAU** Maître de conférence, Université de Bretagne Occidentale

**Thierry AUBRY** Professeur, Université de Bretagne Occidentale



## REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier l'ensemble des personnes ayant participé au bon déroulement de ces années de thèse.

Je remercie l'ancien directeur du laboratoire, Luis Tito de Morais, et la directrice actuelle, Géraldine Sarthou, de m'avoir accueillie au sein du LEMAR.

J'adresse également mes remerciements à Concetta Messina et Benoit Cudennec pour avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux de thèse, et d'examiner ce travail lors de la soutenance aux côtés de Rozenn Le Berre et Laurent Picot, que je remercie tout autant d'avoir accepté d'être examinateurs.

Je remercie Stéphanie Bordenave et Joël Fleurence d'avoir fait partie de mon comité de thèse, merci pour vos conseils et votre bienveillance.

Je remercie tout particulièrement mes directrices, Gwenaëlle Le Blay et Fabienne Guérard, ainsi que mes encadrantes, Claire Hellio et Valérie Stiger-Pouvreau, pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et offert l'opportunité de faire partie de ce projet. Merci pour votre confiance, pour votre bienveillance, et surtout, pour votre soutien au cours de cette aventure parfois compliquée. J'ai apprécié travailler avec vous sur ce sujet riche et dense qui a pu être mené à bien grâce à nos nombreux échanges et vos conseils. J'espère travailler de nouveau avec vous sur de beaux projets.

Je tiens à remercier le projet Interreg VB Atlantic Area (EAPA\_151/2016) BLUEHUMAN, ainsi que, la Région Bretagne (Allocations de Recherche Doctorale) pour avoir financé ce projet de thèse.

Je suis reconnaissante envers tous ceux qui m'ont aidée sur les plans scientifiques et techniques, en commençant, évidemment, par l'équipe de Biodimar qui a évolué au cours de ces années. Un merci tout particulier à Marilyne F., tu me soutiens depuis mon stage de master et me guides dans le monde fascinant et compliqué des substances naturelles. Merci également à Yannick Y., Marina G., Steven N., Marie-Aude P., Valentin F., Florian L. et Fanny A., certains ont été des petites mains en or pour le projet, et vous avez tous été sources de bonne humeur et de soutien. Avec de la chance je pourrai bientôt rejoindre l'équipe, si on pousse un peu les murs.

Je remercie les collègues de l'IRDL, merci à Thierry A. de m'avoir fait découvrir le domaine insoupçonné de la rhéologie. Merci également à Philippe R. de m'avoir initié à une infime partie de ce domaine, et surtout, d'avoir accepté mes répliqués malgré des expériences beaucoup trop longues.

Merci à Philippe E. pour toutes les images en microscopie électronique et les découvertes artistiques libres d'interprétation au sein des échantillons.

Je tiens à remercier les partenaires de BIOSKEL-CCMAR, Vincent L. et Joana T.R., pour les analyses ostéogéniques, j'espère que nos résultats feront partie d'un beau papier.

Je souhaite remercier le duo de choc de la plateforme RMN-RPE, Stéphane C. et Gaëlle S., merci de toujours prendre le temps pour répondre à mes questions et me conseiller.

Merci aux stagiaires que j'ai pu co-encadrer, Noémie G. et Nolwenn K., je vous souhaite bonne continuation dans vos thèses respectives et j'espère pouvoir être présente à vos soutenances.

Merci aux personnes du secrétariat du LEMAR d'avoir été là pour m'aider sur les questions administratives, et surtout, pour les commandes ô combien nombreuses avec trois devis chacune, évidemment.

Je remercie toutes les personnes du laboratoire pour la bonne ambiance générale, c'est un plaisir de venir tous les jours pour vous voir. Pensée toute particulière à la team café pour ces moments de convivialité, parfois "hors-la-loi", car la pause-café est sacrée !

Un grand merci à la tribu des doctorants passés et actuels, bien trop nombreux pour être tous cités, pour les bons moments. Force et honneur à ceux qui sont encore dans l'aventure !

Je remercie évidemment le légendaire bureau A107, merci à Kévin T., Valentin S., José C., Laura S., Mallorie B., Léna T., Clément T., Maëva G. et Clémentine L. pour cette bonne ambiance au quotidien qui sait se faire sérieuse au besoin. Merci de m'avoir encouragée jusqu'à la fin de ma thèse et d'accepter tous les sujets de conversation même les plus geeks. Faites attention à l'hypoglycémie en mon absence et ne vous battez pas pour mon bureau.

Un merci particulier à Mariana V. et Antoine B. qui sont là depuis le début de ma thèse même s'ils envahissent petit à petit mon labo !

Merci aussi à tous ceux que j'ai dû oublier. Ces années étaient vraiment chouettes !

Un petit merci aux artistes de la bande son de soutien à la rédaction de ce manuscrit à l'origine des BO d'Hadès, d'Arcane et de Disney, ainsi qu'Orelsan et Ghost B.C.

Je remercie évidemment tous mes amis en-dehors du laboratoire. Merci aux Pampettes, aux Porthos, aux Rôlistes et aux Angevins, vous avez toujours été là pour me changer les idées et partager de bons moments, malheureusement rares en cette fin de thèse. Ils vont pouvoir recommencer de plus belle !

Un immense merci à ma famille pour m'avoir toujours soutenue. Merci à mes parents, mes sœurs, mon frère et ma Nanny d'avoir toujours été présents pour moi. Une pensée pour mon Grand-père. Vous serez tous fiers de moi !

Et bien sûr, je remercie Yoran, le meilleur pour la fin. Merci de m'avoir soutenue à tout moment, tu es toujours là pour me booster. Je te souhaite encore un peu de courage pour finir ta thèse. Bientôt, nous serons tous les deux docteurs !



© Jade Buscaglia

## SOMMAIRE

AVANT-PROPOS .....	8
LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES TABLEAUX .....	17
LISTE DES ABREVIATIONS .....	19
INTRODUCTION GENERALE CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE .....	21
CHAPITRE I ETAT DE L'ART .....	29
1. Présentation de la molécule de collagène .....	30
1.1. Structure et fonctions du collagène .....	30
1.2. Biosynthèse du collagène .....	33
1.3. Formes du collagène .....	36
2. Utilisations actuelles du collagène par les humains.....	37
3. L'ingénierie tissulaire.....	37
4. Le tissu osseux.....	41
4.1. Fonctions du tissu osseux.....	41
4.2. Structure osseuse .....	42
4.3. Composition du tissu osseux .....	45
4.4. Cellules osseuses .....	45
4.5. Remodelage osseux.....	46
4.6. Traumatismes osseux .....	47
4.7. Les thérapies osseuses .....	48
4.8. Les limites des traitements.....	49
5. Stratégie développée au cours de la thèse .....	50
5.1. Développement d'un biomatériau .....	50
5.2. Caractérisation des molécules.....	57
CHAPITRE II DEVELOPPEMENT D'UN BIOMATERIAU RETICULE A BASE DE COLLAGENE DE SAUMON.....	79
1. Préambule .....	80

2.	Manuscrit du premier article scientifique .....	82
2.1.	Résumé .....	83
2.2.	Abstract .....	84
2.3.	Introduction.....	85
2.4.	Materials and methods .....	87
2.5.	Results and discussion.....	92
2.6.	Conclusion .....	108
3.	Optimisation et analyses complémentaires.....	110
3.1.	Clarification du collagène .....	110
3.2.	Optimisation du protocole .....	111
3.3.	Analyses complémentaires non exploitables.....	113
3.4.	Analyses prévues mais non réalisées par défaillance de partenaires .....	114
3.5.	Autre source de collagène marin analysée .....	114
4.	Conclusion .....	115
CHAPITRE III COMPOSES PHENOLIQUES BIOACTIFS ISSUS DE VEGETAUX MARINS ET ISOLES PAR UN PROCEDE D'EXTRACTION CONVENTIONNEL .....		119
1.	Préambule .....	120
2.	Manuscrit du deuxième article scientifique.....	123
2.1.	Résumé .....	124
2.2.	Abstract .....	125
2.3.	Introduction.....	126
2.4.	Materials and methods .....	128
2.5.	Results .....	132
2.6.	Discussion .....	146
2.7.	Conclusion .....	150
3.	Analyses complémentaires.....	152
4.	Conclusion .....	153

CHAPITRE IV COMPOSES PHENOLIQUES BIOACTIFS ISSUS DE VEGETAUX MARINS ET ISOLES PAR UN PROCEDE D'EXTRACTION ECORESPONSABLE .....	157
1. Préambule .....	158
2. Manuscrit du troisième article scientifique .....	161
2.1. Résumé .....	162
2.2. Abstract .....	163
2.3. Introduction.....	164
2.4. Materials and methods .....	166
2.5. Results .....	171
2.6. Discussion .....	181
2.7. Conclusion .....	185
3. Analyses complémentaires.....	187
3.1. Analyses de l'activité ostéogénique .....	187
3.2. Analyses préliminaires de l'activité antibiofilm.....	187
4. Conclusion .....	189
CHAPITRE V DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	193
1. Développement d'un biomatériau réticulé à base de collagène de saumon .....	196
2. Composés phénoliques bioactifs issus de végétaux marins et isolés par un procédé d'extraction conventionnel.....	198
3. Composés phénoliques bioactifs issus de végétaux marins et isolés par un procédé d'extraction écoresponsable .....	199
4. Fonctionnalisation du biomatériau collagénique avec les composés phénoliques bioactifs .	200
5. Les perspectives ouvertes par ce travail de thèse .....	201
6. Conclusion générale .....	206
REFERENCES .....	209
ANNEXES.....	235



## AVANT-PROPOS

Cette thèse a été réalisée à l'Université de Bretagne Occidentale (UBO) dans le Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR UMR 6539) sous la codirection de Gwenaëlle Le Blay et de Fabienne Guérard, professeures à l'UBO (LEMAR) et sous la supervision de Claire Hellio, professeure à l'UBO (LEMAR/BIODIMAR) et de Valérie Stiger-Pouvreau, maître de conférences HDR à l'UBO (LEMAR). Ces travaux ont été financés par le projet Interreg VB Atlantic Area (EAPA\_151/2016) BLUEHUMAN et par le Région Bretagne dans le cadre des Allocations de Recherche Doctorale (ARED - n°585). Elle a bénéficié de l'appui et du soutien logistique de nombreux partenaires.



## NOTES SUR LA REDACTION

Ce manuscrit est écrit en français, toutefois, l'essentiel des chapitres est rédigé en anglais en vue de futures publications. Les références citées tout au long du manuscrit sont regroupées dans la partie Références page 209.

### Article en révision

Buscaglia M., Guérard F., Roquefort P., Aubry T., Fauchon M., Toueix Y., Stiger-Pouvreau V., Hellio C. & Le Blay G. (*submitted*) **Mechanically enhanced *Salmo salar* gelatin by enzymatic cross-linking: premise of a bioinspired material for food packaging, cosmetics and biomedical applications.** *Marine Biotechnology*

### Articles en préparation

Buscaglia M., Le Blay G., Fauchon M., Kergosien N., Laizé V., Rosa J.T., Simon G., Cérantola S., Toueix Y., Aulanier F., Negri S., Guérard F., Hellio C. & Stiger-Pouvreau V. (*in preparation*) **Marine macrophyte extracts enriched in natural bioactive phenolic compounds with antioxidant and osteogenic activities.**

Buscaglia M., Le Blay G., Fauchon M., Gloanec N., Toueix Y., Aulanier F., Negri S., Cérantola S., Guérard F., Stiger-Pouvreau V. & Hellio C. (*in preparation*) **Eco-friendly procedure to generate valuable active and antibacterial polyphenolic purified fractions from marine macrophytes.**

### Communications orales

Buscaglia Manon, Fauchon M., Toueix Y., Stiger-Pouvreau V., Hellio C., Le Blay G. & Guérard F. (2019) **Development of a marine collagen-based biomaterial for bone tissue engineering.** Oceanext. 3-5 Juillet 2019. Nantes, France.

Buscaglia Manon, Fauchon M., Toueix Y., Stiger-Pouvreau V., Hellio C., Le Blay G. & Guérard F. (2019) **Development of a new biomaterial for bone tissue engineering: enzyme cross-linked collagen from salmon (*Salmo salar*).** Polymerix. 2-3 Juillet 2019. Rennes, France.

**Premier prix du poster**

Buscaglia Manon, Stiger-Pouvreau V., Hellio C., Guérard F. & Le Blay G. (2018) **Development and functionalization of marine biomaterials for tissue engineering.** SeaTechWeek. 8-12 Octobre 2018. Brest, France.

## Rapports des stagiaires co-encadrés durant la thèse

Kergosien N. (2020) **Isolation of polyphenols from marine macrophytes with antioxidant and antibacterial activities** – Rapport de stage de Master 2 Sciences de la Mer et du Littoral, mention Biotechnologies Marines (International) (UBO). 36 pages + annexes.

Gloanec N. (2019) **Recherche d'extraits enrichis en composés phénoliques de macroalgues et de plantes halophytes pour la recherche d'activités antibactériennes et antibiofilms contre des bactéries responsables d'infections osseuses** – Rapport de stage Master 2 Sciences, Technologies, Santé, mention Microbiologie Fondamentale et Appliquée (UBO) / Diplôme d'ingénieurs en agroalimentaire (ESIAB). 35 pages + annexes.

## Articles dans la presse

**Sciences Ouest n°383** « Du collagène de saumon pour réparer les os » - par Paule-Emilie Ruy. Octobre 2020.

**Sillage n°213** « L'innovation médicale par les algues » - par Damien Goret. Octobre 2018.

## Médiation avec le public

**Jeunes Reporters des Arts, des Sciences et de l'Environnement** (2021) – Présentation par des élèves de terminale du Lycée La Pérouse-Kerichen encadrés par Brigitte Marco. Juin 2021. Océanopolis, Brest, France.

**Festival Imaginasciences** (2020) – Les rencontres de l'image scientifique pour la jeunesse – Podcast par Emma Duboc. Octobre 2020. Annecy, France.

## ACTIVITE D'ENSEIGNEMENT

**123 heures de TP/TD** durant les années universitaires 2019/2020 et 2020/2021 dans les unités d'enseignement suivantes :

- Diversité de la Biologie (Licence 1)
- Biologie animale (Licence 1 et Licence 3)

Intervenante et encadrante dans l'UE Sciences et Sociétés en 2019 (Master 2)

## LE PROJET BLUEHUMAN

Le projet européen Interreg (2018-2021) VB Atlantic Area (EAPA\_151/2016) BLUEHUMAN est un projet collaboratif regroupant des partenaires académiques, des centres et agences de transfert de l'innovation et des entreprises de cinq pays européens : le Portugal, l'Espagne, la France, l'Irlande et le Royaume-Uni. Les seize partenaires (**Annexe 1**) sont associés autour d'une thématique commune, priorisant l'innovation et les transferts entre partenaires pour faciliter l'émergence de nouveaux produits, services et procédés. Le projet BLUEHUMAN porte sur les biotechnologies bleues comme voie d'innovation pour la santé humaine en visant une croissance intelligente dans l'espace Atlantique. Le projet est coordonné par le groupe de recherche 3B's (Université de Minho, Portugal) et il fait suite à trois précédents projets : VALBIOMAR, BIOTECMAR et MARMED. Il vise à promouvoir la valorisation des ressources marines renouvelables de l'espace Atlantique, ainsi que des coproduits de la pêche, en optimisant le processus industriel et le développement de produits à haute valeur ajoutée dédiés aux secteurs de la médecine et du bien-être global.



Site internet : <http://bluehuman.cetmar.org/>

Les objectifs majeurs du projet BLUEHUMAN en lien avec cette thèse :

- **Objectif 1 : Biomatériaux d'origine marine pour l'ingénierie tissulaire**

Développer des biomatériaux innovants d'origine marine pour l'ingénierie tissulaire afin d'améliorer les processus de régénération des tissus humains. Les biomatériaux serviront de support pour le développement cellulaire et/ou permettront d'administrer des médicaments pour une thérapie avancée. Les matériaux privilégiés sont les hydrogels et les éponges à base de collagène marin de poissons et de méduses, renforcés par réticulation et pouvant être combinés à du sulfate de chondroïtine issu de poissons cartilagineux, de l'élastine ou de l'acide hyaluronique.

- **Objectif 2 : Dispositifs médicaux**

Développer des dispositifs médicaux pour le traitement thérapeutique de pathologies osseuses, cartilagineuses et cutanées en utilisant des matériaux isolés de coproduits marins. Des structures 3D à base de collagène marin et de phosphate de calcium (dents de requin) permettraient de soutenir le développement d'ostéoblastes et la régénération des tissus. Des structures complexes en tri-couches pourraient intervenir dans la thérapie avancée des tissus contenant à la fois du cartilage et de l'os en alliant des collagènes de types I et II, de l'acide hyaluronique et du sulfate de chondroïtine. Des membranes combinant du collagène de méduse et de la gomme gellane pourraient servir de bandages et pansements pour la protection et l'hydratation des plaies cutanées. Enfin, des biocéramiques marines combinées à des particules métalliques pourraient être utilisées afin de traiter l'hyperthermie dans les maladies osseuses ou sous forme de nanoparticules biocéramiques associées au collagène pour produire des nano-composants dans le but de combler les défauts osseux.

- **Objectif 3 : Ingrédients marins pour les produits cosmétiques, bien-être et santé**

Identifier de nouveaux composés marins issus de macroalgues, de plantes halophytes et de cyanobactéries présentant des bioactivités intéressantes pour les secteurs de la cosmétique et de la santé humaine. Les propriétés ciblées sont des activités anaboliques osseuses, antioxydantes, antimicrobiennes et/ou anti-biofilm pour les cosmétiques, le bien-être et la santé ; des activités anti-obésité pour le bien-être et la santé ; et des systèmes à base de nanoparticules pour fournir des hydrolysats marins pour des applications cosmétiques.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans ces trois axes de recherche du projet BLUEHUMAN.

**INTRODUCTION GENERALE** - Contexte et objectifs de la thèse

**Figure 0.1.** Exemples de coproduits issus de la transformation du poisson..... 23

**CHAPITRE I** – Etat de l’art

**Figure I.1.** Schéma de la structure à quatre niveaux de fibres de collagène de type I. .... 32

**Figure I.2.** Représentation schématique de l'assemblage supramoléculaire des fibrilles de collagène.  
..... 32

**Figure I.3.** Représentation schématique de la synthèse du collagène ..... 35

**Figure I.4.** Diverses applications des biomatériaux à base de collagène dans la régénération des tissus.  
..... 40

**Figure I.5.** Représentation schématique du développement des cellules hématopoïétiques ..... 42

**Figure I.6.** Structure d’un os long (humérus) ..... 43

**Figure I.7.** Disposition microstructurale d'un os long représenté sans la cavité médullaire..... 44

**Figure I.8.** Cycle du remodelage osseux..... 46

**Figure I.9.** Schéma des réactions de réticulation du collagène selon les réactifs employés. .... 54

**Figure I.10.** Réticulation enzymatique des résidus de Glutamine et Lysine menant à une nouvelle liaison peptidique. .... 55

**Figure I.11.** Structures des flavonoïdes, acides phénoliques et tannins..... 59

**Figure I.12.** Structures des phlorotannins..... 60

**Figure I.13.** Voies impliquées dans la biosynthèse des polyphénols. .... 63

**Figure I.14.** Voie de biosynthèse potentielle du phloroglucinol. .... 64

**Figure I.15.** Photo de *Beta vulgaris* subsp. *maritima*..... 70

**Figure I.16.** Photo de *Bifurcaria bifurcata*..... 71

**Figure I.17.** Photo de *Cladophora rupestris*. .... 72

**Figure I.18.** Photo de *Codium fragile*. .... 73

**Figure I.19.** Photo de *Crithmum maritimum*..... 74

**Figure I.20.** Photos de *Plantago lanceolata*. .... 75

**CHAPITRE II** - Développement d’un biomatériau réticulé à base de collagène de saumon

**Figure II.1.** Visualisation des différentes étapes du protocole optimisé de réticulation enzymatique par la tansglutaminase microbienne du collagène de type I de peau de saumon atlantique. .... 81

**Figure II.2.** SDS-PAGE profiles of the native gelatin samples. .... 93

<b>Figure II.3.</b> SEC-HPLC profiles of the native gelatin samples.....	94
<b>Figure II.4.</b> Storage modulus and loss modulus as a function of temperature for native salmon and porcine gelatins. ....	97
<b>Figure II.5.</b> Storage modulus and loss modulus as a function of heating temperature for salmon gelatins. ....	98
<b>Figure II.6.</b> Storage modulus and loss modulus as a function of heating temperature for porcine gelatins. ....	99
<b>Figure II.7.</b> Cross-linking degree of native and cross-linked sponges for salmon and porcine gelatins .....	100
<b>Figure II.8.</b> Representative microstructures of vertical sections of gelatin sponges by SEM .....	101
<b>Figure II.9.</b> FTIR spectra of the native and cross-linked samples of salmon gelatin .....	103
<b>Figure II.10.</b> Macroscopic demonstration of hydrogel stability after 7 days at 40°C.....	105
<b>Figure II.11.</b> Syneresis rate of cross-linked salmon gelatin hydrogels after 24 h and 7 days at 40°C. ....	106
<b>Figure II.12.</b> Macroscopic demonstration of sponge stability after 7 days in hydrated conditions at 40°C .....	107
<b>Figure II.13.</b> Swelling rate of cross-linked salmon gelatin sponge after 7 days and 1 month in hydrated conditions at 40°C. ....	107
<b>Figure II.14.</b> Protocole de clarification du collagène de saumon obtenu par solubilisation dans de l'eau distillée et centrifugation .....	111
<b>Figure II.15.</b> Effet de l'ajout d'azoture de sodium à 0,02% et de l'étape d'inactivation d'enzyme sur les hydrogels MTG10 après 6 jours à température ambiante (17-20°C) dans des contenants scellés. ...	113

**CHAPITRE III** - Composés phénoliques bioactifs issus de végétaux marins et isolés par un procédé d'extraction conventionnel

<b>Figure III.1.</b> Protocole de la purification liquide/liquide réalisée sur les extraits bruts.....	121
<b>Figure III.2.</b> Protocole de l'extraction en phase solide (SPE) réalisée sur les fractions acétate d'éthyle. ....	122
<b>Figure III.3.</b> Etape du processus de criblage des fractions purifiées de végétaux marins, utilisant le système d'opercule du poisson zèbre (modèle zebrafish).....	122
<b>Figure III.4.</b> Total phenolic contents of crude extracts (CE), dichloromethane fractions (DCM), aqueous fractions (AQ) and ethyl acetate fractions (EA) from the macrophytes <i>Beta maritima</i> , <i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Cladophora rupestris</i> and <i>Plantago lanceolata</i> .....	133
<b>Figure III.5.</b> Radical scavenging activity (DPPH, IC50) of crude extracts (CE), dichloromethane fractions (DCM), aqueous fractions (AQ) and ethyl acetate fractions (EA) from the macrophytes <i>Beta maritima</i> , <i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Cladophora rupestris</i> and <i>Plantago lanceolata</i> .....	134

<b>Figure III.6.</b> Effect of ethyl acetate fraction (EA) from the macrophytes <i>Beta maritima</i> , <i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Cladophora rupestris</i> and <i>Plantago lanceolata</i> on the mineralization of zebrafish operculum area (% over negative control).....	135
<b>Figure III.7.</b> <sup>1</sup> H-NMR spectra of <i>Beta maritima</i> , <i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Cladophora rupestris</i> and <i>Plantago lanceolata</i> crude extracts, ethyl acetate fractions (EA) and aqueous fractions (AQ).....	137
<b>Figure III.8.</b> Total phenolic contents of ethyl acetate fractions (EA) and the SPE fractions (FI: H <sub>2</sub> O fraction, FII: 30% ethanol fraction, and FIII: 100% ethanol fraction) from the macrophytes <i>Beta maritima</i> , <i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Cladophora rupestris</i> and <i>Plantago lanceolata</i> .....	139
<b>Figure III.9.</b> Radical scavenging activity (DPPH, IC <sub>50</sub> ) of ethyl acetate fractions (EA) and the SPE fractions (FI: H <sub>2</sub> O fraction, FII: 30% ethanol fraction, and FIII: 100% ethanol fraction) from the macrophytes <i>Beta maritima</i> , <i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Cladophora rupestris</i> and <i>Plantago lanceolata</i> .	140
<b>Figure III.10.</b> Effect of the SPE FII (30% ethanol fraction) from the macrophytes <i>Beta maritima</i> , <i>Bifurcaria bifurcata</i> and <i>Plantago lanceolata</i> on the mineralization of zebrafish operculum area. ..	141
<b>Figure III.11.</b> <sup>1</sup> H-NMR spectra of <i>Beta maritima</i> , <i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Cladophora rupestris</i> and <i>Plantago lanceolata</i> ethyl acetate fractions (EA) and the SPE fractions (FI: H <sub>2</sub> O fraction, FII: 30% ethanol fraction, and FIII: 100% ethanol fraction).....	143
<b>Figure III.12.</b> HMBC assignments of the purified FII (30% ethanol fraction) obtained by SPE purification of the ethyl acetate fraction from the brown macroalgae <i>Bifurcaria bifurcata</i> .....	144

**CHAPITRE IV** - Composés phénoliques bioactifs issus de végétaux marins et isolés par un procédé d'extraction écoresponsable

<b>Figure IV.1.</b> Protocole de la purification par résine macroporeuse Diaion HP-20 réalisée sur les extraits bruts. ....	159
<b>Figure IV.2.</b> Protocole de chromatographie Flash réalisée sur la fraction F30 de <i>Bifurcaria bifurcata</i> . Chromatographie Flash/UV Spot Flash d'Armen Instrument (France) de la plateforme Biodimar....	160
<b>Figure IV.3.</b> Total phenolic contents of crude extracts and Diaion fractions (F30 and F99) from five species of macroalgae and coastal plants.....	172
<b>Figure IV.4.</b> Radical scavenging activity (DPPH, IC <sub>50</sub> ) of crude extracts and Diaion fractions (F30 and F99) from four species of macroalgae and coastal plants. ....	173
<b>Figure IV.5.</b> Effect of <i>Bifurcaria bifurcata</i> F30 fraction (a) and <i>Plantago lanceolata</i> F99 fraction (b) on bacterial growth compared to the control without inhibitor .....	175
<b>Figure IV.6.</b> <sup>1</sup> H-NMR spectra of <i>Bifurcaria bifurcata</i> crude extract, residual fraction and Diaion fractions (F30 and F99).....	176
<b>Figure IV.7.</b> Total phenolic content (a) and their associated radical scavenging activity (b) in <i>Bifurcaria bifurcata</i> F30 fraction and FC fractions (H <sub>2</sub> O, ACN10, ACN20 and ACN30).....	177



<b>Figure IV.8.</b> $^1\text{H}$ -NMR spectra of the <i>Bifurcaria bifurcata</i> F30 and FC fractions (H <sub>2</sub> O, ACN10, ACN20 and ACN30).....	180
<b>Figure IV.9.</b> HMBC assignments of the purified <i>Bifurcaria bifurcata</i> ACN30 fraction .....	181
<b>Figure IV.10.</b> Effet de la fraction F30 de <i>Bifurcaria bifurcata</i> (a) et de la fraction F99 de <i>Plantago lanceolata</i> (b) sur la formation du biofilm chez <i>Escherichia coli</i> DSM 1103 et <i>Staphylococcus aureus</i> DSM 346 comparé au contrôle sans inhibiteur .....	188

**CHAPITRE I** – Etat de l’art

<b>Tableau I.1.</b> Types, formes, distributions et fonctions des collagènes.....	30
<b>Tableau I.2.</b> Propriétés physiques typiques de différentes gélatines.....	52
<b>Tableau I.3.</b> Principales méthodes de réticulation du collagène.....	53

**CHAPITRE II** - Développement d’un biomatériau réticulé à base de collagène de saumon

<b>Tableau II.1.</b> Sample codes and compositions.....	89
<b>Tableau II.2.</b> Proximal analysis results of S-NAT.....	92
<b>Tableau II.3.</b> Molecular weight (MW) distribution of the gelatin samples by SEC-HPLC.....	94
<b>Tableau II.4.</b> Amino acid composition of native gelatin samples.....	95
<b>Tableau II.5.</b> Mean pore size (µm) of salmon gelatin sponges.....	102
<b>Tableau II.6.</b> FTIR relative absorbance of the native and cross-linked samples of salmon gelatin ....	104
<b>Tableau II.7.</b> Tampons testés pour la clarification du collagène de saumon.....	110

**CHAPITRE III** - Composés phénoliques bioactifs issus de végétaux marins et isolés par un procédé d'extraction conventionnel

<b>Tableau III.1.</b> Mass yields (%) after extraction (crude extract – CE) and liquid/liquid semi-purification (ethyl acetate fraction – EA, and aqueous fraction – AQ) from the macrophytes <i>Beta maritima</i> , <i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Cladophora rupestris</i> and <i>Plantago lanceolata</i> .....	132
<b>Tableau III.2.</b> Mass yields (%) after the SPE purification (FI: H2O fraction, FII: 30% ethanol fraction, and FIII: 100% ethanol fraction) of the ethyl acetate (EA) fractions from the macrophytes <i>Beta maritima</i> , <i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Cladophora rupestris</i> and <i>Plantago lanceolata</i> .....	138
<b>Tableau III.3.</b> Chemical shifts of <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C signals of FII (30% ethanol fraction) obtained by SPE purification of the ethyl acetate fraction from the coastal plant <i>Plantago lanceolata</i> .....	145
<b>Tableau III.4.</b> Effet de la fraction acétate d'éthyle (EA) et des fractions SPE (FI : fraction H2O, FII : fraction éthanol à 30 %, et FIII : fraction éthanol à 100 %) de <i>Beta maritima</i> , <i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Cladophora rupestris</i> et <i>Plantago lanceolata</i> sur la croissance bactérienne de <i>Staphylococcus epidermidis</i> DSM 1798 par rapport au contrôle sans inhibiteur .....	152
<b>Tableau III.5.</b> Effet de la fraction acétate d'éthyle (EA) et des fractions SPE (FI : fraction H2O, FII : fraction éthanol à 30 %, et FIII : fraction éthanol à 100 %) de <i>Bifurcaria bifurcata</i> et <i>Plantago lanceolata</i> sur la croissance bactérienne d' <i>Escherichia coli</i> DSM 1103 par rapport au contrôle sans inhibiteur	153

**CHAPITRE IV** - Composés phénoliques bioactifs issus de végétaux marins et isolés par un procédé d'extraction écoresponsable

**Tableau IV.1.** Effect of *Bifurcaria bifurcata* F30 fraction and FC fractions (H<sub>2</sub>O, ACN10, ACN20 and ACN30) on bacterial growth compared to the control without inhibitor ..... 179

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ACN</b>	: Acétonitrile	<b>MBC</b>	: Concentration bactéricide minimale
<b>ALP</b>	: Phosphatase alcaline	<b>MEB</b>	: Microscopie électronique à balayage
<b>ANOVA</b>	: Analyse de la variance	<b>MHA</b>	: Mueller-Hinton agar
<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection	<b>MHB</b>	: Mueller-Hinton broth
<b>dpf</b>	: Jour post-fécondation	<b>MIC</b>	: Concentration minimale inhibitrice
<b>DPPH</b>	: 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle	<b>MTG</b>	: Transglutaminase microbienne
<b>EUCAST</b>	: Comité européen sur les tests de sensibilité aux antimicrobiens	<b>OD</b>	: Densité optique
<b>FAO</b>	: Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture	<b>OPA</b>	: O-phthalaldéhyde
<b>FC</b>	: Chromatographie Flash	<b>PC</b>	: Composé phénolique
<b>FTIR</b>	: Spectroscopie à transformée de Fourier	<b>pH</b>	: Potentiel hydrogène
<b>Gly</b>	: Glycine	<b>PMMA</b>	: Polyméthacrylate de méthyle
<b>GTA</b>	: Glutaraldéhyde	<b>Pro</b>	: Proline
<b>HMBC</b>	: Corrélacion des liaisons multiples hétéronucléaires	<b>RMN</b>	: Résonance magnétique nucléaire
<b>Hyp</b>	: Hydroxyproline	<b>ROS</b>	: Espèces réactives de l'oxygène
<b>Hz</b>	: Hertz	<b>RP18</b>	: Colonne en phase inverse
<b>IC50</b>	: Concentration inhibitrice médiane	<b>SD</b>	: Ecart type
<b>ISO</b>	: Organisation internationale de normalisation	<b>SDS-PAGE</b>	: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
<b>kDa</b>	: Kilodalton	<b>SEC-HPLC</b>	: Chromatographie d'exclusion stérique
<b>LC-MS</b>	: Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse	<b>SPE</b>	: Extraction sur phase solide
<b>LEMAR</b>	: Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin	<b>TG</b>	: Transglutaminase
<b>LOX</b>	: Lysyl-oxidase	<b>UBO</b>	: Université de Bretagne Occidentale
		<b>UMR</b>	: Unité mixte de recherche
		<b>UV</b>	: Ultraviolet



---

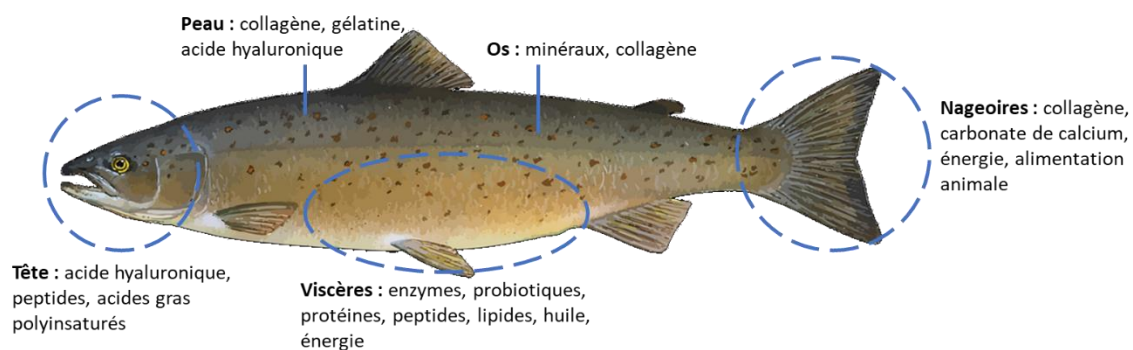
# **INTRODUCTION GENERALE**

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE

---

L'environnement marin est une source de biomasses exploitables par l'Homme, notamment pour son alimentation. En 2018, la production mondiale de poissons, crustacés et mollusques était d'environ 178,5 millions de tonnes, pêche et aquaculture confondues, dont 88% étaient destinés à l'alimentation humaine, le reste servant majoritairement à la production de farines et d'huiles pour l'alimentation animale (FAO 2020). Quant à la production mondiale d'algues, elle représentait 32,4 millions de tonnes en 2018 provenant majoritairement de l'aquaculture (97,1%) et d'Asie (57,1% de Chine, 28,8% d'Indonésie et 13,6% du reste de l'Asie) (FAO 2020). Les ressources halieutiques sont une source importante de protéines de haute qualité et de nutriments pour les humains, et représentent, également, un important secteur économique (Caruso et al. 2020; Ali et al. 2021).

Au cours de la transformation des animaux, comme le filetage des poissons, une grande quantité de sous-produits est générée, pouvant atteindre 75% du poids de l'animal. Ces sous-produits regroupent la tête, les viscères, la peau, les écailles, les nageoires, les arêtes, le sang, ou bien encore, les exosquelettes pour les crustacés. N'étant pas directement utilisables ou commercialisables, ils peuvent être traités comme des coproduits ou des déchets (Al Khawli et al. 2019; Caruso et al. 2020; Ali et al. 2021). Cette importante biomasse sous-exploitée est généralement utilisée pour l'alimentation animale à faible valeur ajoutée ou éliminée par incinération. Cependant, il s'agit d'une source non-négligeable de composés : protéines et peptides, collagène et gélatine, enzymes, chitine et chitosan, lipides et acides gras polyinsaturés, minéraux et vitamines, qui sont valorisables après traitement des matières premières (**Figure 0.1**) (Centella et al. 2017; Al Khawli et al. 2019; Caruso et al. 2020; Ali et al. 2021; Zhou et al. 2021). En effet, ces molécules trouvent des applications en alimentation, en nutraceutique, en cosmétique et en médecine (Al Khawli et al. 2019; Caruso et al. 2020; Ali et al. 2021). Dans l'industrie alimentaire, certaines molécules comme les protéines sont utilisées en tant qu'agents émulsifiants, moussants, solubilisants, stabilisants ou hydratants dans les produits laitiers et carnés (Al Khawli et al. 2019). Le collagène et la gélatine peuvent servir de film alimentaire comestible ou de gélifiant (Centella et al. 2017). Ces molécules sous-valorisées possèdent également des bénéfices pour la santé telles que des activités antitumorales, antidiabétiques, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antioxydantes, ou encore, immunomodulatrices (Al Khawli et al. 2019; Ali et al. 2021). A titre d'exemple, la consommation d'acides gras polyinsaturés tels que les oméga 3, EPA (acide eicosapentaénoïque) et DHA (acide docosahexaénoïque), est notamment associée à une diminution des maladies cardiovasculaires (Al Khawli et al. 2019). Les ressources animales ne sont pas les seules à pouvoir être valorisées autrement qu'en aliments.



**Figure 0.1.** Exemples de coproduits issus de la transformation du poisson. Inspiré de Al Khawli et al. (2019) et Caruso et al. (2020).

De leur côté, les algues produisent des molécules pouvant être extraites à des fins alimentaires, nutraceutiques, cosmétiques ou médicales, telles que des polysaccharides, des lipides, des acides gras, des stérols, des composés phénoliques ou des pigments (De Jesus Raposo et al. 2015; Centella et al. 2017; Wang et al. 2017; Caruso et al. 2020; Amador-Castro et al. 2021). Les algues rouges (Rhodophyta) sont connues pour la production d'agar-agar ou de carraghénanes selon les espèces, et les algues brunes (Phaeophyceae) pour la production d'alginate, de fucoïdanes et de laminarines. Ces divers polysaccharides sont des phycocolloïdes servant à texturiser, épaissir, stabiliser et gélifier les produits dans divers domaines d'applications. Ces polysaccharides ont également des applications potentielles dans le domaine médical, en tant que pansements, antioxydants, antibactériens, antifongiques, anticoagulants ou anti-inflammatoires (De Jesus Raposo et al. 2015; Centella et al. 2017; Amador-Castro et al. 2021). Les caroténoïdes, les chlorophylles et les phycobiliprotéines sont des pigments algaux utilisés comme colorants dans les aliments et les cosmétiques (Centella et al. 2017). Les algues présentent également des applications en agriculture par la production de molécules pouvant agir sur la croissance et par leur teneurs en certains nutriments, bénéfiques pour les cultures (Amador-Castro et al. 2021).

Les produits et coproduits marins présents dans l'industrie alimentaire jouent un rôle important dans le bon fonctionnement et l'amélioration de la santé humaine en raison de leurs composants hautement nutritifs dont certains à forte valeur ajoutée tels que les peptides dotés d'activités biologiques (Ali et al. 2021). De plus, la recherche de nouvelles voies de valorisation des biomasses marines est la clé pour une gestion durable des ressources naturelles, une réduction du gaspillage et des déchets (Caruso et al. 2020). Depuis plusieurs années, la valorisation de ces composés sous-utilisés a attiré l'attention des acteurs de l'industrie, en raison de l'attrait des consommateurs pour des produits plus naturels, mais également, par l'augmentation des connaissances scientifiques sur la possibilité d'extraire et concentrer des composés à haute valeur ajoutée tels que les protéines, les



enzymes, les huiles, l'hydroxyapatite, le collagène et la gélatine en ingrédients pour les industries nutraceutiques, cosmétiques et médicales (Centella et al. 2017; Al Khawli et al. 2019; Ali et al. 2021). Dans les contextes écologiques et économiques actuels, est apparu le souhait de s'éloigner de la pétrochimie pour tendre vers un modèle plus responsable par l'utilisation de produits biosourcés, qui produisent moins de déchets et sont préférentiellement biodégradables (Centella et al. 2017). Cette vision plus vertueuse s'intègre dans l'évolution d'une économie linéaire vers une économie circulaire. Dans une économie circulaire, l'attention sera portée sur une sélection de critères tels que (Centella et al. 2017; Caruso et al. 2020) :

- L'**écoconception** en améliorant la conception du produit pour pouvoir le réutiliser ou le recycler plutôt que le jeter.
- La **modularité** et la **polyvalence** de l'utilisation pour éviter l'obsolescence du produit et diversifier ses utilisations.
- L'utilisation de **matières** et **énergies renouvelables** pour agir contre les changements climatiques globaux, réduire l'émission de gaz à effet de serre, assurer la durabilité du produit et réduire voire éliminer la consommation de ressources fossiles ou non renouvelables.
- L'**approche écosystémique** en prenant en compte les impacts sur l'environnement depuis la production jusqu'à la fin de vie du produit en améliorant le développement écologique.
- La **récupération des matériaux** en utilisant des produits ou matériaux recyclés à la place de matières neuves.

Ainsi, valoriser les produits alimentaires de la mer dans leur globalité s'intègre dans un objectif d'économie circulaire en réduisant l'impact des secteurs de la pêche et de l'aquaculture, tout en améliorant leurs performances économiques.

Ce travail de recherche propose de valoriser plusieurs ressources naturelles renouvelables ; d'une part, des coproduits de la transformation du saumon atlantique (*Salmo salar*), à savoir la peau dont est extrait le collagène ; et d'autre part, de macroalgues et plantes halophiles afin d'obtenir des composés phénoliques bioactifs selon deux méthodologies pour les extraire, les purifier et les caractériser. Ces deux parties visent une valorisation potentielle dans les domaines médicaux et principalement l'ingénierie tissulaire osseuse par la production d'un biomatériau.

Pour étudier la valorisation de ces molécules, une approche globale a été menée en associant principalement de la biochimie, de la rhéologie, de la microscopie, de la microbiologie et de la physiologie. Ainsi, cette étude vise à développer un biomatériau à base de collagène marin pour

l'ingénierie tissulaire osseuse, avec une recherche parallèle de composés phénoliques aux propriétés bénéfiques pour la régénération des os, qui pourront être intégrés au biomatériau par la suite.

### **Objectifs de l'étude :**

Le premier objectif a été de développer un biomatériau à base de collagène de peau de saumon dont les propriétés mécaniques et structurelles ont été modifiées par réticulation enzymatique. Le matériau est caractérisé, afin de déterminer les mécanismes et les impacts de la réticulation intervenant au sein de la matrice tridimensionnelle. Le but final est d'obtenir un biomatériau potentiel pour le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse et potentiellement pour d'autres voies de valorisation.

Le deuxième objectif a été d'identifier des composés phénoliques aux potentiels ostéogéniques et/ou antibactériens issus de macroalgues et plantes halophiles des côtes bretonnes. Une comparaison entre deux procédés d'extraction et de purification (conventionnel vs écoresponsable) a été réalisée par la caractérisation des activités et des structures des molécules obtenues. L'objectif à long terme est d'utiliser ces molécules dans le domaine médical, et plus précisément, dans l'amélioration de la consolidation et de la régénération osseuses.

Ainsi, le manuscrit est structuré en cinq chapitres :

- **Chapitre I – Etat de l'art**

Un état de l'art est présenté afin de définir les notions nécessaires à la compréhension de ces travaux de thèse et mettre en avant le cheminement de pensée ayant permis l'identification des problématiques traitées.

- **Chapitre II - Développement d'un biomatériau réticulé à base de collagène de saumon**

Le développement du biomatériau à base de collagène de peau de saumon a été réalisé par une réaction de réticulation enzymatique à l'aide d'une transglutaminase microbienne. Le matériel collagénique brut a été caractérisé en amont par des analyses proximales (teneurs en humidité, en cendres, en acides aminés ...), par électrophorèse, par chromatographie et par rhéologie. Le protocole de réticulation enzymatique a, par la suite, été optimisé en fonction des résultats obtenus sur les biomatériaux par des analyses rhéologiques, microscopiques, spectroscopiques, biochimiques et de stabilité. Le chapitre II est construit sous forme d'une publication scientifique, à laquelle ont été ajoutées des informations complémentaires sur les essais d'optimisation de la réticulation.

○ **Chapitre III – Composés phénoliques bioactifs issus de végétaux marins et isolés par un procédé d'extraction conventionnel**

L'extraction et la purification de composés phénoliques bioactifs ont tout d'abord été faites en utilisant une démarche conventionnelle qui sert de référence dans cette thèse. Ainsi, les composés ont été extraits par une macération et purifiés par une technique liquide/liquide suivie d'une extraction sur phase solide (SPE). Les teneurs en composés phénoliques, les structures chimiques, les activités antiradicalaires et ostéogéniques ont été mesurées tout au long du processus. Une analyse préliminaire sur les activités antibactériennes de certains échantillons a également été menée. Le chapitre III est construit sous forme d'une publication scientifique, à laquelle ont été ajoutées des informations complémentaires sur les procédés utilisés, les activités et les métabolites obtenus.

○ **Chapitre IV - Composés phénoliques bioactifs issus de végétaux marins et isolés par un procédé d'extraction écoresponsable**

A la suite du chapitre III, les composés phénoliques ont été obtenus en suivant un protocole plus écoresponsable associant une macération ainsi qu'une purification sur une résine Diaion HP-20 et par une chromatographie Flash. Les teneurs en composés phénoliques, les structures chimiques, les activités antiradicalaires et antibactériennes ont été mesurées tout au long du processus. Le chapitre IV est construit sous forme d'une publication scientifique, à laquelle ont été ajoutées des informations complémentaires sur les procédés utilisés, les activités et les métabolites obtenus.

○ **Chapitre V - Discussion générale et perspectives**

Ce manuscrit se termine par une synthèse des principaux résultats obtenus et des conclusions formulées dans les différentes parties afin de les discuter. Le but est de mettre en avant les hypothèses validées par l'étude. Des pistes d'analyses complémentaires nécessaires à la continuité de ce travail seront également proposées. Enfin, l'ensemble de ces travaux ouvre de nombreuses perspectives qui seront identifiées.





---

# CHAPITRE I

## ÉTAT DE L'ART

---

## 1. PRESENTATION DE LA MOLECULE DE COLLAGENE

### 1.1. *Structure et fonctions du collagène*

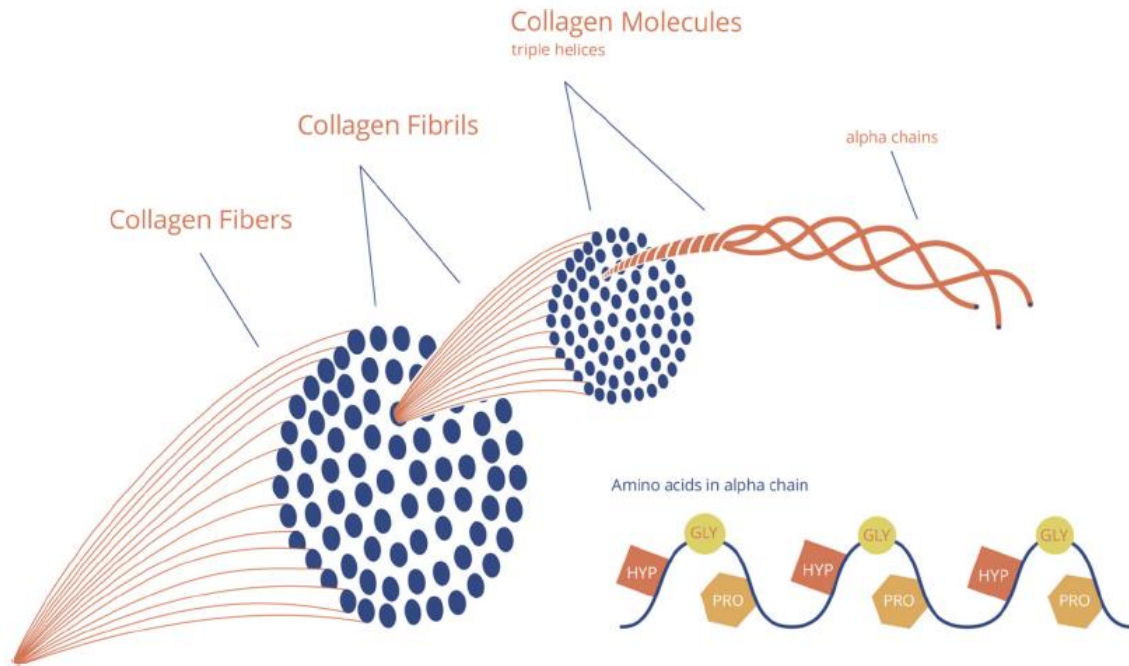
Le collagène est une protéine extracellulaire primordiale et majoritaire des tissus conjonctifs, qui peut représenter jusqu'à 30% des protéines totales des animaux multicellulaires (Bae et al. 2008; Cheng et al. 2019). Les collagènes sont des glycoprotéines séparées en 29 types selon leur origine génétique, leur localisation et leur structure (Bae et al. 2008; Lv et al. 2019; Adamiak and Sionkowska 2020) (Tableau I.1).

**Tableau I.1.** Types, formes, distributions et fonctions des collagènes. Source : Lin et al. (2019).

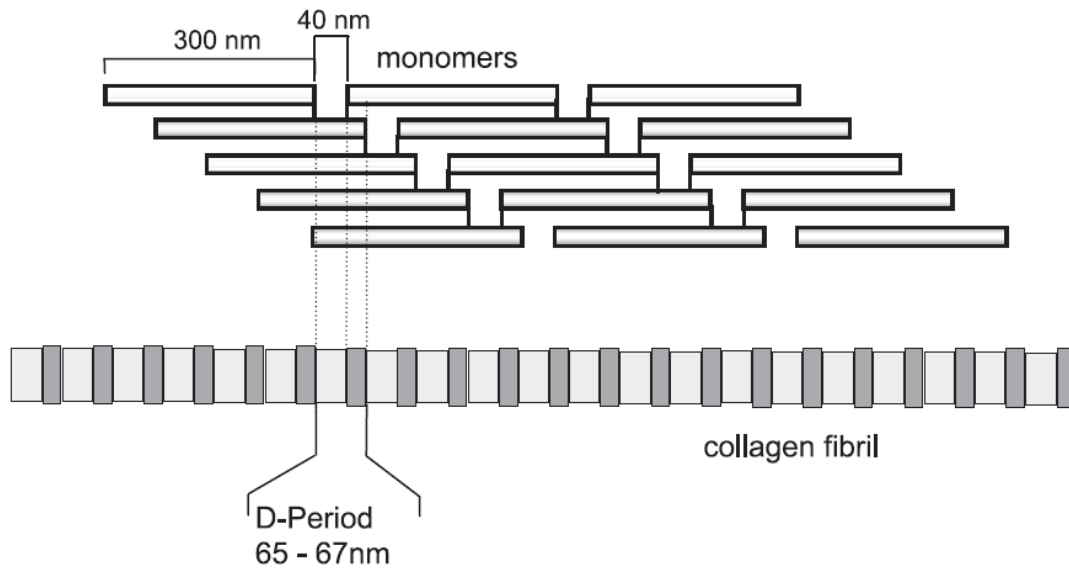
Type	Molecular form	Tissue distribution	Function
I	Fibrils	Noncartilagineous connective tissues, e.g., skin, bone, tendon, dentin, ligaments, cornea	Structural component
II	Fibrils	Hyaline cartilage, vitreous body, nucleus pulposus	Structural component
III	Fibrils	Idem as type I	Structural component
IV	Network	Basement membranes	Presynaptic organizer
V	Fibrils	Idem as type I	Structural component
VI	Beaded filaments	Muscle, skin, cartilage, placenta, lungs, vessel wall, vessel	Structural component
VII	Anchoring fibrils	Skin, dermo-epidermal junction, oral mucosa, cervix	Retaining dermal-epidermal adhesion
VIII	Network	Descemet's membrane	Structural and signaling component
IX	FACIT	Idem as type II	Retaining tissue integrity
X	Network	Hypertrophic cartilage, growth plate	Regulating endochondral ossification
XI	Fibrils	Idem as type II	Structural component
XII	FACIT	Tendon, skin, periodontal ligament	Not clear
XIII	Transmembrane	Epidermis, hair follicle, endomysium, intestine, chondrocyte, lung, liver, dermo-epidermal junction	Regulating bone formation
XIV	FACIT	Skin, tendon, vessel wall, placenta, lungs, liver	Maintaining mechanical tissue
XV	Endostatins	Fibroblast, smooth muscle cell, kidney, pancreas	Not clear
XVI	FACIT	Fibroblast, amnion, keratinocyte	Protecting neurons against A $\beta$ toxicity
XVII	Transmembrane	Derma-epidermal junction	Structural component
XVIII	Endostatins	Lung, liver, vascular, epithelial basement membrane	Associated with eye development and basement membrane integrity
XIX	FACIT	Central neurons, human rhabdomyosarcoma	Associated with hippocampal synapses
XX	FACIT	Corneal epithelium, embryonic skin, sternum cartilage, tendon	Not clear
XXI	FACIT	Heart, placenta, stomach, jejunum, skeletal muscle, kidney, lung, pancreas, lymph node	Not clear
XXII	FACIT	Myotendinous junction, cartilage-synovial fluid, hair follicle-dermis	Retaining tissue junctions
XXIII	Transmembrane	Prostate	Associated with prostate cancer
XXIV	Fibrils	Cornea, bone	Regulating osteoblast differentiation
XXV	Transmembrane	Precursor protein for collagenous Alzheimer amyloid plaque component	Associated with Alzheimer's disease
XXVI	Beaded filaments	Testis and ovary	Associated with generation and modeling of tissues
XXVII	Fibrils	Cartilage, skin, cartilage, cornea, retina, major arteries of the heart	Cartilage calcification
XXVIII	Beaded filaments	Peripheral nerves, skin calvaria,	Not clear
XXIX	Beaded filaments	Skin, lung, small intestine, colon	Associated with atopic dermatitis

Dans cette étude, nous nous focalisons sur le type I qui est majoritaire dans l'organisme humain (90% du collagène) et qui se retrouve notamment dans la peau, la cornée, les tendons, les ligaments et les os (Yi et al. 2006; Abraham et al. 2008; Abou Neel et al. 2013). Sa structure fibreuse en triple hélice d'environ 300 KDa est constituée de deux chaînes homologues  $\alpha 1$  (codées par le gène COL1A1) et d'une chaîne hétérologue  $\alpha 2$  (codée par le gène COL1A2), dont la composition chimique varie légèrement (Gelse et al. 2003; Abou Neel et al. 2013; Nijhuis et al. 2019). Ces chaînes  $\alpha$  torsadées vers la gauche sont des polypeptides composés de 1050 acides aminés chacune suivant la séquence Gly-X-Y, où Gly symbolise la Glycine (27-35% des acides aminés totaux) et X et Y représentent généralement la Proline (Pro) et l'Hydroxyproline (Hyp) (20-24%) (Djabourov et al. 1993; Silvipriya et al. 2015; Huang et al. 2019). Les chaînes  $\alpha$  se connectent entre elles sur leur longueur par des liaisons hydrogènes réversibles entre les groupes CO et NH majoritairement des Prolines et Hydroxyprolines (Jongjareonrak et al. 2006; Mohtar et al. 2011; Cheng et al. 2019). Les chaînes  $\alpha$  de 80-125 KDa forment des dimères  $\beta$  ( $\beta 11$  ou  $\beta 12$  selon les chaînes  $\alpha$  concernées) de 160-250 KDa et des triples hélices  $\gamma$  enroulées vers la droite de 240-375 KDa aussi nommées tropocollagène (Djabourov et al. 1993; Gómez-Guillén et al. 2002; Song et al. 2006; Bae et al. 2008; Bhagwat and Dandge 2018; Cheng et al. 2019; Huang et al. 2019). La structure de la triple hélice est compacte, du fait de la présence de Glycine tous les trois acides aminés des chaînes  $\alpha$ . La Glycine est, en effet, le plus petit acide aminé avec une chaîne latérale hydrogénée simple. Son faible encombrement stérique lui permet de se retrouver au centre de la triple hélice en un cœur hydrophobe pour que les chaînes  $\alpha$  s'imbriquent étroitement entre elles (Bhagwat and Dandge 2018; Huang et al. 2019). Ces triples hélices s'interconnectent parallèlement par des liaisons intermoléculaires covalentes pour former les fibrilles de collagène, puis des fibres de collagène (**Figure I.1**). La structure en quinconce donne une apparence striée aux fibres de collagène visible en microscopie électronique en transmission (**Figure I.2**) (Djabourov et al. 1993; Ferreira et al. 2012; Bhagwat and Dandge 2018). Cette structure fibreuse exerce principalement des fonctions structurelles et mécaniques dans l'organisme en conférant flexibilité, stabilité, intégrité et résistance aux tissus conjonctifs (Bae et al. 2008; Ahmad et al. 2010; Ferreira et al. 2012; Abou Neel et al. 2013; Bhagwat and Dandge 2018).





**Figure I.1.** Schéma de la structure à quatre niveaux de fibres de collagène de type I. GLY : glycine, PRO : proline et HYP : hydroxyproline. Source : Nijhuis et al. (2019).



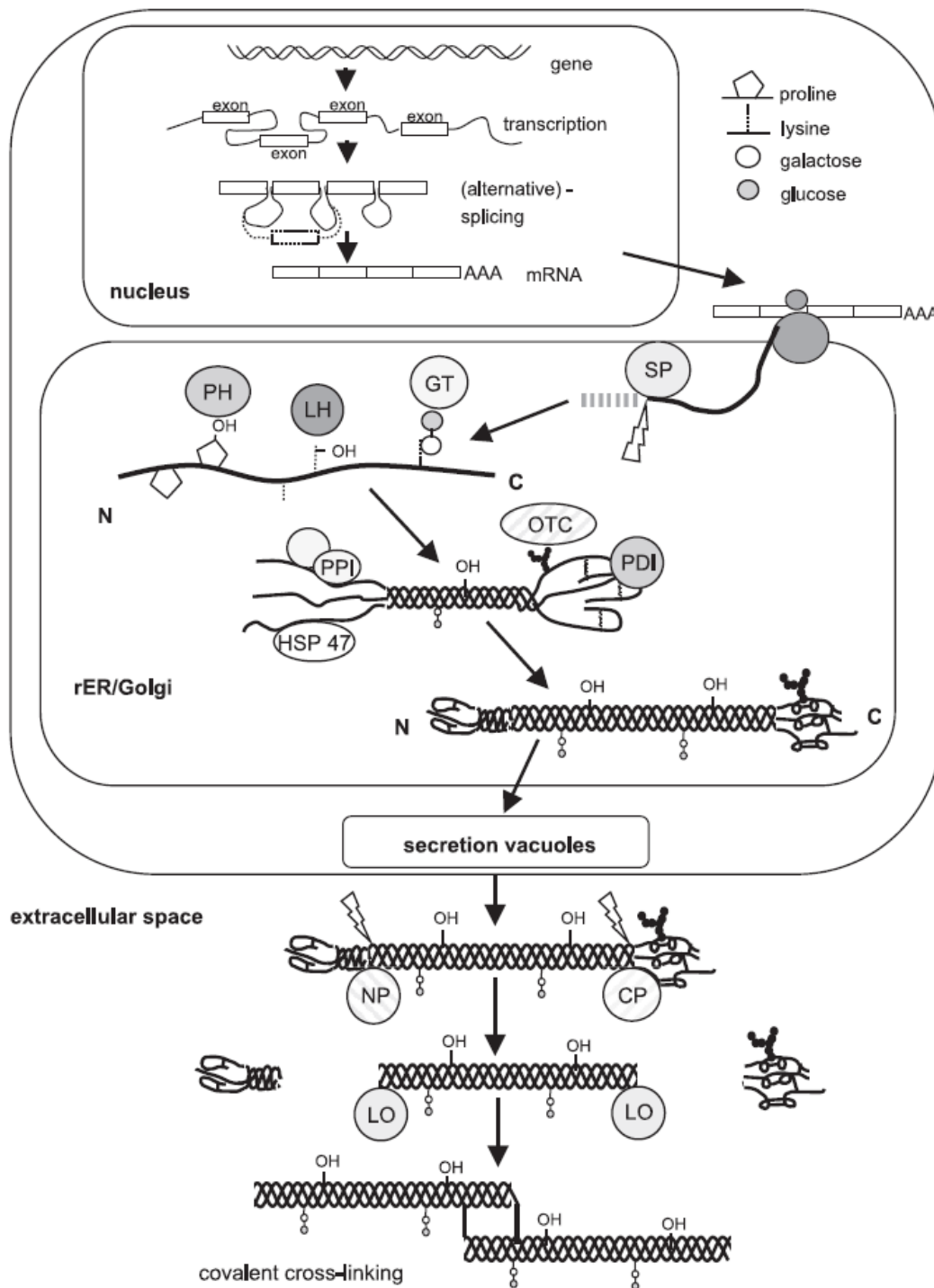
**Figure I.2.** Représentation schématique de l'assemblage supramoléculaire des fibrilles de collagène. Les monomères ont une longueur de 300 nm et des espaces de 40 nm séparent les monomères consécutifs, ce qui donne l'aspect caractéristique des fibrilles de collagène de type I au niveau ultrastructural. Source : Gelse et al. (2003).

## 1.2. Biosynthèse du collagène

Le collagène de type I est majoritairement synthétisé par les fibroblastes des tissus conjonctifs et les cellules épithéliales (Silvipriya et al. 2015). Cette biosynthèse se déroule en plusieurs étapes depuis le noyau des cellules jusqu'au milieu extracellulaire (**Figure I.3**) (Gelse et al. 2003; Bateman et al. 2009).

- **Dans le noyau** : Les gènes COL1A1 et COL1A2 sont transcrits en ARN pré-messagers sous le contrôle de plusieurs facteurs de croissance et de cytokines. Les ARN pré-messagers sont soumis à un épissage alternatif donnant les ARN messagers (ARNm). Une maturation des ARNm se fait par l'ajout d'une coiffe méthylée à leur extrémité 5' et une queue poly(A) à leur extrémité 3'. Les ARNm matures sont ensuite exportés vers le cytoplasme.
- **Dans le cytoplasme** : Les ARNm sont traduits par les ribosomes en précurseurs du collagène, les procollagènes  $\alpha 1$  ou  $\alpha 2$  selon le gène d'origine. Ils sont insolubles dans le milieu physiologique ce qui permet la synthèse intracellulaire du collagène. Ces précurseurs sont plus longs que le collagène final car ils possèdent des domaines globulaires polypeptidiques à leurs extrémités, les propeptides N-terminaux et C-terminaux. Ces procollagènes sont introduits dans la lumière du réticulum endoplasmique au cours de leur synthèse grâce à la présence d'un peptide de signal.
- **Dans le réticulum endoplasmique** : Le peptide de signal est clivé par une peptidase et les modifications post-traductionnelles des procollagènes commencent. Les résidus Proline sont modifiés par des hydroxylases en 3-Hydroxyproline et 4-Hydroxyproline. Ce sont ces résidus 4-Hydroxyproline qui assurent majoritairement les liaisons hydrogènes intramoléculaires et assurent l'intégrité des monomères et des fibrilles ainsi que la stabilité thermique des domaines hélicoïdaux du collagène. Les organismes vivants dans des environnements à basse température présentent moins d'hydroxylation. Les résidus Lysine sont également transformés par des lysylhydroxylases en Hydroxylysine qui assurent la stabilité du collagène par des liaisons intermoléculaires covalentes. Des sites d'O-glycolysation sont formés ainsi des carbohydrates comme le galactose ou le glucose peuvent s'y fixer. Les enzymes entrant en jeu nécessitent la présence de cofacteurs tels que les ions fers, la vitamine C et le dioxygène. La formation des multimères débute par l'alignement de trois procollagènes suivi par leur association à partir de leurs extrémités C-terminales pour former la triple hélice jusqu'à leurs extrémités N-terminales.

- **Dans l'appareil de Golgi** : Les triples hélices de procollagènes sont sécrétées dans le milieu extracellulaire par exocytose de vésicules depuis l'appareil de Golgi.
- **Dans le milieu extracellulaire** : Les propeptides N-terminaux et C-terminaux sont clivés par des propeptidases associées pour former la molécule de collagène nommée tropocollagène dont les extrémités non-hélicoïdales sont des télépeptides N-terminaux et C-terminaux. Les molécules de tropocollagène vont s'assembler spontanément parallèlement entre elles à proximité de la surface cellulaire pour former les fibrilles et fibres de collagène qui structurent les tissus conjonctifs. L'assemblage se fait par interactions polaires, hydrophobes et covalentes, et est renforcé par une réticulation. L'enzyme lysyl-oxydase lie les extrémités N-terminale et C-terminale de deux molécules de collagène adjacentes, c'est la fibrillogénèse.



**Figure 1.3.** Représentation schématique de la synthèse du collagène à partir de la transcription nucléaire des gènes du collagène, du traitement de l'ARNm, de la synthèse des protéines ribosomiques (traduction) et des modifications post-traductionnelles, de la sécrétion et des étapes finales de la formation des fibrilles. (SP: signal peptidase; GT: hydroxylysyl galactosyltransferase and galactosylhydroxylysyl glucosyltransferase; LH: lysyl hydroxylase; PH: prolyl hydroxylase; OTC: oligosaccharyl transferase complex; PDI: protein disulphide isomerase; PPI: peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase; NP: procollagen N-proteinase; CP: procollagen C-proteinase; LO: lysyl oxidase; HSP47: heat shock protein 47, colligin1). Source : Gelse et al. (2003).

### 1.3. Formes du collagène

Au sein de la matrice extracellulaire, le collagène sous sa forme de tropocollagène en triple hélice est également nommé collagène natif, afin de le distinguer de sa forme partiellement hydrolysée. En effet, dans le monde industriel, le terme collagène regroupe le collagène natif et la gélatine, deux formes différentes, parfois confondues, de la même macromolécule. La gélatine est obtenue par une hydrolyse partielle du collagène, à la suite d'un traitement thermique, rompant les liaisons hydrogènes entre les chaînes  $\alpha$  du collagène et libérant ainsi les sous-unités qui se replient aléatoirement en pelote (Djabourov et al. 1993; Chen and Shi 2013; Caruso et al. 2020). Ces unités de gélatine ont la particularité intrinsèque de pouvoir se réarranger entre elles pour reformer des triples hélices partielles semblables à celles du collagène natif, par le processus de gélification. Il s'agit d'un processus thermodynamique réversible qui se déroule en plusieurs étapes à l'échelle microscopique (Harrington and Rao 1970; Djabourov 1988; Djabourov et al. 1988a, b; Jeong et al. 2012; Bello et al. 2020) :

- La **nucléation** : Les unités de gélatine vont s'interconnecter via des liaisons hydrogènes aléatoires par l'interaction entre les résidus Proline et Hydroxyproline, qui sont favorables à la nucléation par leur rigidité localisée. Un réseau de macromolécules linéaires reliées par des zones de jonctions cristallines se forme. Les triples hélices se développent de façon exponentielle en quelques minutes.
- L'**agrégation** : Les triples hélices formées vont s'agréger parallèlement et grandir lentement.
- L'**équilibre** : La structure n'atteint jamais une stabilité complète, il faudrait ajouter un agent de réticulation pour former des liaisons covalentes.

Ainsi, en diminuant la température, la transition pelote  $\rightarrow$  hélice se déroule à l'échelle microscopique et impacte la structure macroscopique en solidifiant la solution liquide en gel bien défini et élastique, si la concentration en molécule est suffisante (transition sol-gel). Étant une réaction thermoréversible, si le gel est chauffé à environ 36°C pour du collagène de mammifère, la transition hélice  $\rightarrow$  pelote se produit, et à 40-50°C la gélatine est sous forme de pelote et complètement dissoute (transition gel-sol). Plusieurs paramètres affectent le processus de gélification tels que les forces ioniques, le pH, le poids moléculaire, la concentration et l'origine du collagène (Djabourov et al. 1988a; Bello et al. 2020).

Un gel est défini comme un système cohésif homogène avec deux composants, une substance solide finement dispersée ou dissoute dans une phase liquide et qui se comporte comme un solide sous l'action de forces mécaniques (Djabourov 1988, 1991). On peut considérer deux types de gels (Chen and Shi 2013; Bello et al. 2020) :

- Le **gel physique** dont les jonctions sont formées et défaites de façon réversible par des liaisons hydrogènes, par exemple, et qui est sensible aux variations de températures, de pH, etc ... Il est généralement utilisé comme matériau fonctionnel grâce à sa propriété intrinsèque de transitions sol-gel et gel-sol.
- Le **gel chimique** est formé par des liaisons covalentes par le procédé de réticulation. Il est généralement utilisé comme matériau de structure en raison de ses propriétés mécaniques.

## **2. UTILISATIONS ACTUELLES DU COLLAGÈNE PAR LES HUMAINS**

Le collagène ainsi que sa forme hydrolysée, la gélatine, sont valorisés dans les industries alimentaire, cosmétique et médicale en raison de leur biocompatibilité, leur biodégradabilité et leur capacité d'adhésion cellulaire, leur faible antigénicité ainsi que leur biodisponibilité (Drury and Mooney 2003; Silvipriya et al. 2015; Elango et al. 2017; Bhagwat and Dandge 2018; Sundar et al. 2020). Dans le secteur de l'alimentaire, le collagène et la gélatine servent de stabilisants, d'émulsifiants ou d'agents moussant afin de modifier les propriétés fonctionnelles des produits. Ces protéines peuvent également être utilisées comme film alimentaire pour protéger les aliments du séchage, de l'oxydation ou des dégradations microbiennes (Gómez-Estaca et al. 2009; Ehrlich 2015; Bhagwat and Dandge 2018). En cosmétique, ces composants servent d'humectants et d'hydratants naturels en inclusion dans des dermocosmétiques tels que des produits anti-âge et anti-rides (Abou Neel et al. 2013; Alves et al. 2017). Dans le domaine médical, l'utilisation de cette protéine biomimétique remonte au 19<sup>e</sup> siècle où son comportement et son potentiel en tant que greffe ont été explorés. Depuis, elle a été beaucoup étudiée et les résultats ont démontré un potentiel important comme biomatériau en ingénierie tissulaire jusqu'à l'utilisation de techniques de pointe comme l'électrofilage (ou electrospinning), l'impression 3D et les nanotechnologies (Sundar et al. 2020; Rico-Llanos et al. 2021).

## **3. L'INGENIERIE TISSULAIRE**

Les tissus et les organes sont parfois soumis à des déformations ou destructions causées par des pathologies, des interventions médicales ou des traitements médicaux. La médecine actuelle tente de restaurer les fonctions des tissus et organes endommagés en les remplaçant par des greffes complètes ou partielles, ou par des implants artificiels. Cependant, plusieurs freins peuvent apparaître

comme un rejet immunitaire, une disponibilité limitée des tissus et organes, une morbidité au niveau du site donneur, ou une zone à traiter trop complexe ou trop étendue (Vats et al. 2003; Hollinger et al. 2004).

L'ingénierie tissulaire est le domaine de recherche développant des implants ou substituts biologiques pour maintenir, améliorer ou restaurer les fonctions d'un tissu entier ou partiel. Ces substituts biocompatibles sont qualifiés de biomatériaux depuis le début des années 1960 (Qu et al. 2019).

Les biomatériaux ont des origines et structures diverses mais un rôle commun, celui de soutenir la croissance cellulaire en constituant un environnement propice à l'adhésion, la propagation et la régénération cellulaire (Lee and Mooney 2001). Ainsi, l'ingénierie tissulaire vise la régénération et la restauration des fonctions des organes et des tissus lésés par l'implantation de biomatériaux 3D développés hors du patient. Ces derniers serviront à stimuler et soutenir la croissance cellulaire en réduisant l'apparition des freins précédemment évoqués et particulièrement les réactions immunitaires de rejet (Vats et al. 2003). Les matériaux utilisés dans le domaine biomédical peuvent présenter des fonctions bénignes ou être bioactifs de par leur nature propre ou en synergie avec d'autres substances (Tathe et al. 2010). Leur utilisation au niveau tissulaire nécessite des propriétés structurelles et mécaniques appropriées, semblables au tissu remplacé, afin que l'organisme puisse fonctionner convenablement (Lee and Mooney 2001; Vats et al. 2003; Biswal 2021). L'avantage des matériaux développés hors du patient est la possibilité de les modeler pour les adapter parfaitement à la zone traitée au niveau de la taille, la forme et la compatibilité immunologique par l'ajout de cellules ou molécules de signal pour réguler l'adhésion cellulaire (Vats et al. 2003; Carson and Clarke 2018; Biswal 2021). Ce domaine de recherche et d'applications est en perpétuelle évolution afin de développer des matériaux biocompatibles dotés de propriétés mécaniques spécifiques, en évitant les risques de toxicité et de rejet des greffons (Lee and Mooney 2001). Les éléments nécessaires pour l'ingénierie tissulaire sont une matrice associée à des cellules et des molécules de communication (Vats et al. 2003; Qu et al. 2019; Prasad 2021). La matrice, appelée *scaffold* en anglais, doit apporter un environnement favorable au développement cellulaire, afin de permettre la conduction tissulaire via la fixation, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaires (Vats et al. 2003). Elle doit également permettre une régulation du taux de dégradation de manière concomitante à la formation du nouveau tissu (Biswal 2021). Pour une utilisation optimale, la matrice doit présenter une forme 3D spécifique, une microstructure poreuse, une surface de contact importante, des propriétés mécaniques adéquates, une biocompatibilité et être potentiellement biodégradable. La porosité, les pores interconnectés et la surface doivent être suffisants pour permettre la propagation des cellules en 3D, les interactions cellulaires et la diffusion du sang par capillarité pour apporter les nutriments aux cellules (Vats et al. 2003; Sundar et al. 2020; Biswal 2021). La biodégradabilité est un critère

important si le tissu ciblé ne nécessite pas d'être stabilisé à long terme pour être réparé et remodelé (Vats et al. 2003).

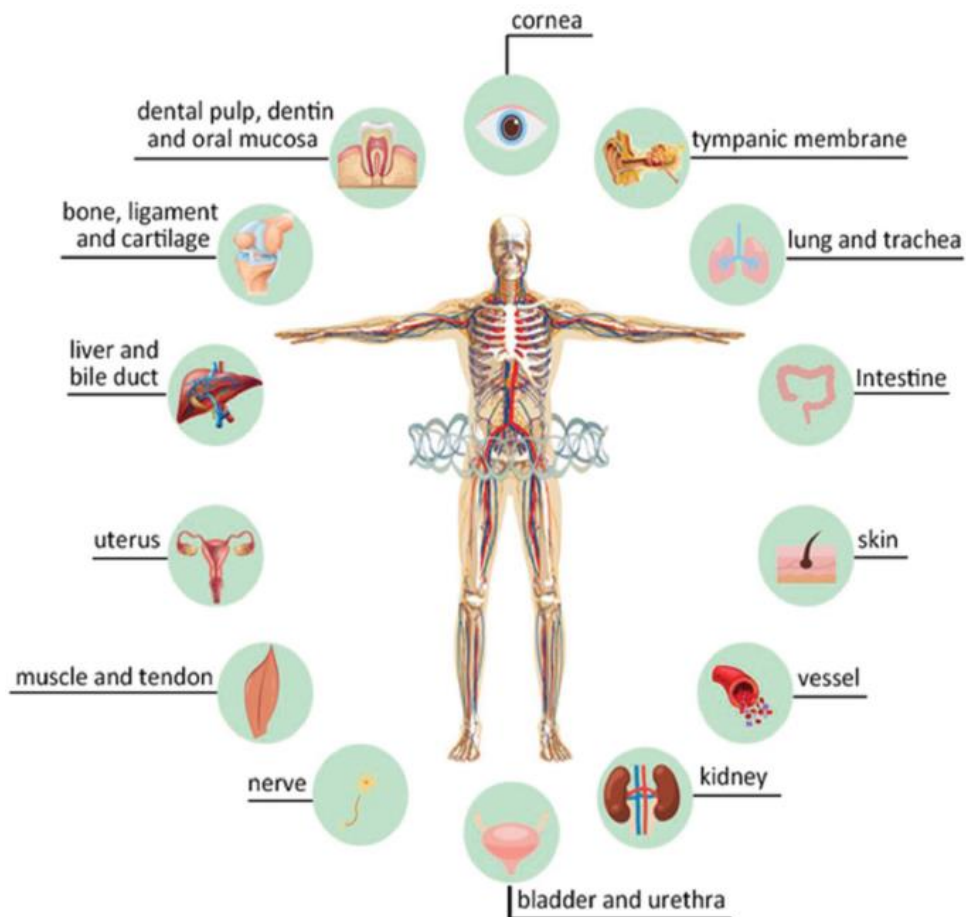
Au cours du temps, la nature et la fonction des biomatériaux ont évolué. Ainsi, les biomatériaux peuvent être séparés selon trois générations (Vats et al. 2003; Hollinger et al. 2004; Qu et al. 2019; Sundar et al. 2020; Biswal 2021) :

- La **première génération** inclut des métaux comme le titane, des polymères synthétiques tels que le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) et le polyétheréthercétone (PEEK) ainsi que des céramiques telles que l'alumine ou le dioxyde de zirconium.
- La **seconde génération** est caractérisée par des biomatériaux bioactifs parfois biodégradables *in vivo* comme des polymères de synthèse tels que l'acide polyglycolique (PGA), l'acide polylactique (PLA), l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA), le polytétrafluoroéthylène (PTFE), le polyéthylène glycol (PEG) ou le nylon qui servent de sutures, de mailles chirurgicales ou encore de greffes de vaisseaux ; des polymères naturels regroupant majoritairement des protéines (collagène, gélatine, élastine, kératine et soie), des polysaccharides (chitosan, glycosaminoglycane (GAG) et alginate), ainsi que des minéraux (sous forme de céramiques de phosphate de calcium, carbonate de calcium et sulfate de calcium ou sous forme de verre à base silice).
- La **troisième génération** comporte les biomatériaux induisant des réponses biologiques bénéfiques spécifiques par l'ajout de substances au sein des biomatériaux de la deuxième génération pour en améliorer les performances.

Les biomatériaux, comme les polymères synthétiques par exemple, n'étant pas présents naturellement dans le corps, peuvent causer des réactions immunitaires, manquer d'éléments favorisant les interactions cellulaires spécifiques et être mécaniquement différents du tissu à remplacer. Quant aux matériaux naturels, s'ils présentent de plus faibles toxicité et immunogénicité, ils sont toutefois généralement moins compétents mécaniquement. Cependant, ces désavantages peuvent être palliés/évités par l'association de plusieurs matériaux naturels ou avec un matériau synthétique (Vats et al. 2003; Sundar et al. 2020; Prasad 2021). Ainsi, des matrices naturelles sont développées sous formes fibreuses, tubulaires ou membranaires, selon l'application visée en régénération des os, des cartilages, des ligaments, des tendons, des nerfs, des vaisseaux sanguins, des valves cardiaques ou encore de la peau, ce qui montre l'ampleur de l'ingénierie tissulaire dans le domaine médical (Vats et al. 2003; Tathe et al. 2010). Le collagène est largement étudié pour imiter la matrice extracellulaire par biomimétisme (Xia et al. 2013; Wang et al. 2019; Ngadimin et al. 2021). Les applications du collagène concernent plusieurs organes et tissus comme la peau, les vaisseaux



sanguins, le système urinaire, les nerfs ou encore les constituants du système squelettique comme les ligaments, les cartilages et les os par le domaine de l'ingénierie tissulaire (Silvipriya et al. 2015; Lin et al. 2019) (Figure I.4).



**Figure I.4.** Diverses applications des biomatériaux à base de collagène dans la régénération des tissus. Source : Lin et al. (2019).

Le collagène est utilisé sous un large éventail de formes galéniques : poudre, microparticules, fibres, films, membranes, tubes, composites, échafaudages, solutions injectables et dispersions (Silvipriya et al. 2015; Bhagwat and Dandge 2018; Lv et al. 2019; Bello et al. 2020; Rico-Llanos et al. 2021). Ce biomatériau sert de pansements pour soigner le tissu cutané suite à des blessures ou des brûlures pouvant causer des infections et de la morbidité tissulaire, si elles ne sont pas traitées. Le derme représentant 70-80% de la peau, est composé majoritairement de collagène, ainsi les pansements de collagène aident le renouvellement cellulaire en guidant naturellement les fibroblastes et les cellules fibrogènes, et en permettant la nucléation des nouvelles fibres de collagènes en présence de sels neutres. Cette régénération est favorisée par la capacité du collagène à conserver l'hydratation ainsi qu'à ses propriétés hémostatiques en association avec les plaquettes, offrant ainsi un environnement

favorable pour les cellules (Silvipriya et al. 2015; Subhan et al. 2020; Sundar et al. 2020). Le collagène sert également en ingénierie tissulaire pour renforcer les tendons, traiter les hernies ainsi qu'en chirurgie plastique et reconstructive (Silvipriya et al. 2015). Sous forme d'éponge/échafaudage (matrice poreuse déshydratée) ou d'hydrogel (matrice poreuse hydratée), il sert d'agent de remplissage des lacunes tissulaires, notamment osseuses, de véhicule pour des médicaments ou des molécules bioactives, et de structure 3D pour aider à l'organisation des cellules et à la formation tissulaire par la création d'un environnement extracellulaire bénéfique avec une haute capacité de stockage d'eau (Drury and Mooney 2003; Subhan et al. 2020; Rico-Llanos et al. 2021). Les hydrogels ont la particularité de pouvoir être injectés dans les zones à traiter pour limiter les interventions chirurgicales invasives, ce qui permet l'administration de médicaments ou de facteurs de croissance (Drury and Mooney 2003). Ses propriétés lui permettent d'améliorer la croissance et la différenciation cellulaires ainsi que la régulation de fonctions de plusieurs types cellulaires (Bhagwat and Dandge 2018). Les cellules régénératrices sont attirées par le collagène, ce qui accélère la synthèse du collagène au niveau de la peau, des ligaments, des cartilages et des os. Ainsi, ce matériau peut être implanté avec ou sans ensemencement cellulaire préalable (Silvipriya et al. 2015; Bhagwat and Dandge 2018). Cette protéine sert également à soigner les troubles vasculaires et cardiaques en tant que substituts de valves cardiaques, les troubles urogénitaux, les défauts de cornée avec des greffes ou lentilles de contact, ou encore les problèmes dentaires (Silvipriya et al. 2015; Lin et al. 2019). Le collagène peut également avoir un rôle dans le développement cellulaire *ex vivo*, en stimulant la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines qui pourront être utilisées pour la régénération de différents tissus humains tels que le foie, les nerfs, les muscles, le cartilage et plus particulièrement les os (Subhan et al. 2020).

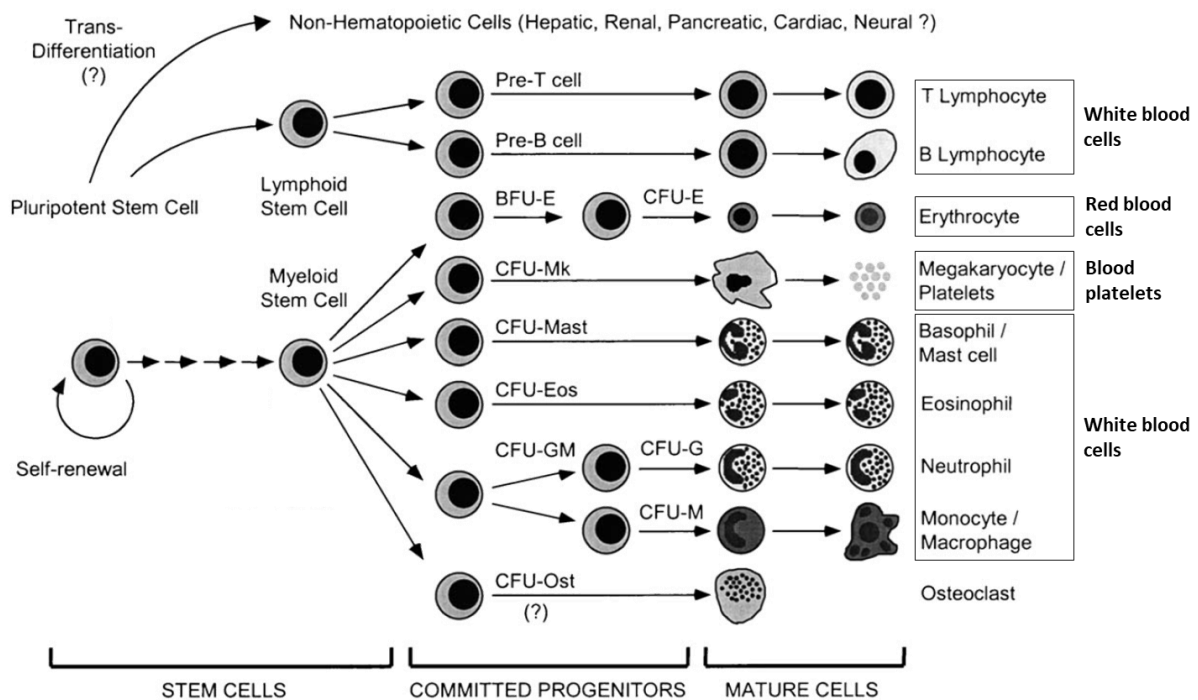
#### 4. LE TISSU OSSEUX

##### 4.1. Fonctions du tissu osseux

Le tissu d'intérêt pour mes travaux de thèse est le tissu osseux. Ce tissu conjonctif, composant complexe du système squelettique, remplit plusieurs fonctions au sein de l'organisme (Barrère et al. 2008; Jordana et al. 2017; Kołodziejaska et al. 2020) :

- **Fonction mécanique** : il sert de soutien au corps, d'aide aux mouvements en association avec les muscles et de protection des organes grâce à sa résistance aux contraintes mécaniques étant l'un des matériaux les plus résistants du corps humain.

- **Fonction métabolique** : il intervient dans le métabolisme phosphocalcique en tant que réserve de minéraux avec plus de 90% des réserves de calcium et phosphore du corps humain qui peuvent être libérés sous l'effet des pressions mécaniques.
- **Fonction hématopoïétique** : il permet la synthèse des cellules souches multipotentes à l'origine des lignées des cellules sanguines telles que les leucocytes (globules blancs), érythrocytes (globules rouges) et thrombocytes (plaquettes) au sein de sa moelle osseuse rouge (**Figure I.5**).



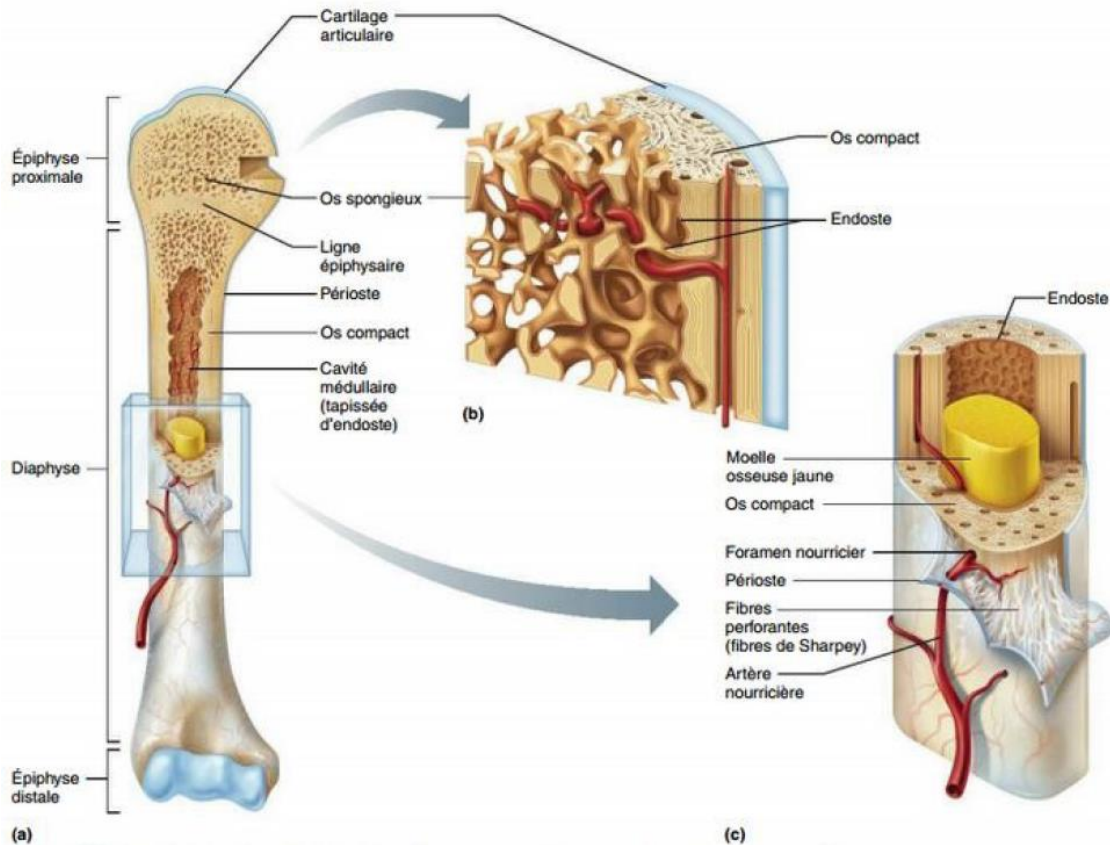
**Figure I.5.** Représentation schématique du développement des cellules hématopoïétiques. (BFU: burst forming unit; CFU: colony forming unit, each followed by the code of the cells concerned). Adapté de Szilvassy (2003).

#### 4.2. Structure osseuse

Le squelette d'un humain adulte possède 206 os séparés en quatre catégories selon leurs formes qui dérivent de différents mécanismes du développement embryonnaire ; les os longs (*e.g.* le fémur, l'humérus et l'ulna), les os courts (*e.g.* les carpes), les os plats (*e.g.* le sternum et les omoplates) et les os irréguliers (*e.g.* les vertèbres) (Hollinger et al. 2004; Khurana et al. 2010).

La structure macroscopique des os longs est composée des épiphyses proximale et distale, de la diaphyse et de la moelle osseuse (**Figure I.6**). Les **épiphyses** sont les extrémités osseuses situées entre le cartilage articulaire et la ligne/plaque épiphysaire qui disparaît au stade adulte en tant que zone de

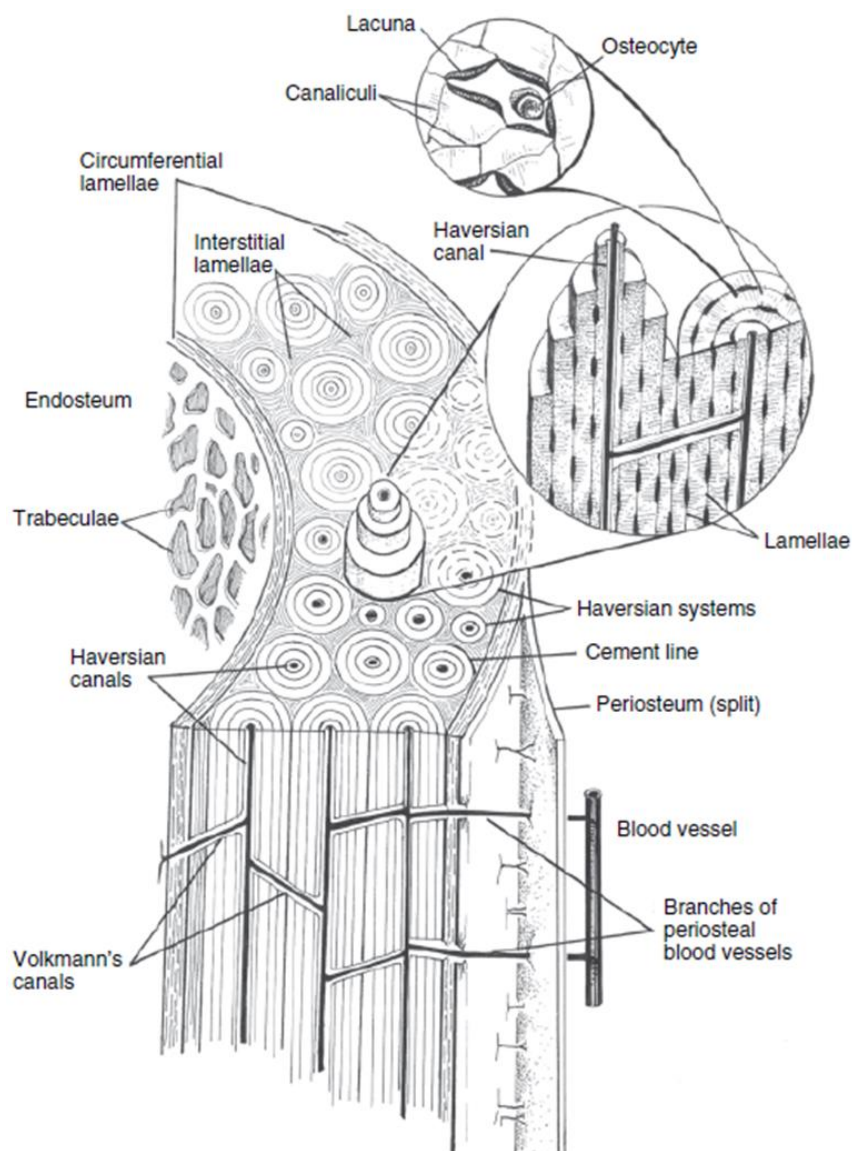
croissance en longueur de l'os. La **diaphyse** est la portion cylindrique entre les épiphyses qui contient la moelle osseuse au cœur d'un cortex épais. La **moelle osseuse** se situe dans la cavité médullaire de la diaphyse, c'est le site de synthèse des cellules immatures des éléments hématopoïétiques.



**Figure 1.6.** Structure d'un os long (humérus). (a) Vue antérieure avec coupe frontale montrant l'intérieur de l'extrémité proximale. (b) Vue tridimensionnelle grossie de l'os spongieux et de l'os compact de l'épiphyse de (a). (c) Coupe transversale grossie du corps (diaphyse) de (a). Source : Marieb and Hoehn (2019).

Les os sont entourés du **périoste**, une fine couche composée d'une partie externe fibreuse et d'une couche interne ostéogène constituée des cellules ostéoprogénitrices et de fibroblastes. Le développement des os débute par la formation d'un **os fibrillaire** (immature) peu ordonné qui se développe en lamelles de 3-7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur organisées parallèlement pour former lentement l'**os lamellaire** (mature). L'organisation secondaire de l'os lamellaire est une juxtaposition de lamelles concentriques, nommées ostéons de 200-300  $\mu\text{m}$  de diamètre séparés par des lignes cimentantes plus denses (**Figure 1.7**). Les **ostéons** possèdent un canal central Haversien d'environ 50  $\mu\text{m}$  de diamètre dans l'axe de la diaphyse contenant des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses. Les os matures sont constitués de deux structures lamellaires, l'os compact cortical et l'os spongieux. L'**os compact**, constituant la majeure partie de la diaphyse des os longs, se trouve à l'intérieur et l'extérieur des os

plats et dans les os courts selon leurs fonctions. Ce tissu dur, rigide mais fragile est formé d'ostéons cylindriques et d'ostéocytes intégrés dans la matrice. L'**os spongieux** représente la majeure partie des épiphyses des os longs, des os courts, plats et irréguliers. Ce tissu est un réseau tridimensionnel formé de travées interconnectées et richement vascularisées. Cette structure rigide englobe les moelles hématopoïétique (rouge) et adipeuse (jaune) et permet une surface d'échange importante avec les liquides interstitiels augmentant ainsi les capacités de régénération tissulaire (Hollinger et al. 2004; Khurana et al. 2010; Markel 2019).



**Figure I.7.** Disposition microstructurale d'un os long représenté sans la cavité médullaire. Source : Markel (2019).

#### 4.3. Composition du tissu osseux

Le tissu osseux est composé d'une matrice extracellulaire associant une partie inorganique et une partie organique (Barrère et al. 2008; Khurana et al. 2010; Qu et al. 2019; Kołodziejska et al. 2020). La **partie inorganique** représente 60-70% des os, c'est une fraction minérale majoritairement constituée de cristaux d'hydroxyapatite organisés en lamelles qui rigidifient le tissu en association à des carbonates, des citrates, des ions sodium, magnésium et chlorure. La **partie organique** représente 20-30% des os, elle sert de trame au tissu et est composée majoritairement de collagène de type I (> 90%), de protéines non-collagéniques permettant la fixation du calcium (ostéonectine et sialoprotéine osseuse), l'adhésion (ostéopontine, fibronectine et thrombospondine) et la minéralisation (ostéocalcine), ainsi que d'enzymes (phosphatase alcaline ALP, collagénase et métalloprotéinase), de cytokines, de facteurs de croissance et de traces de polysaccharides et lipides. La matrice extracellulaire contient également 5-10% d'eau.

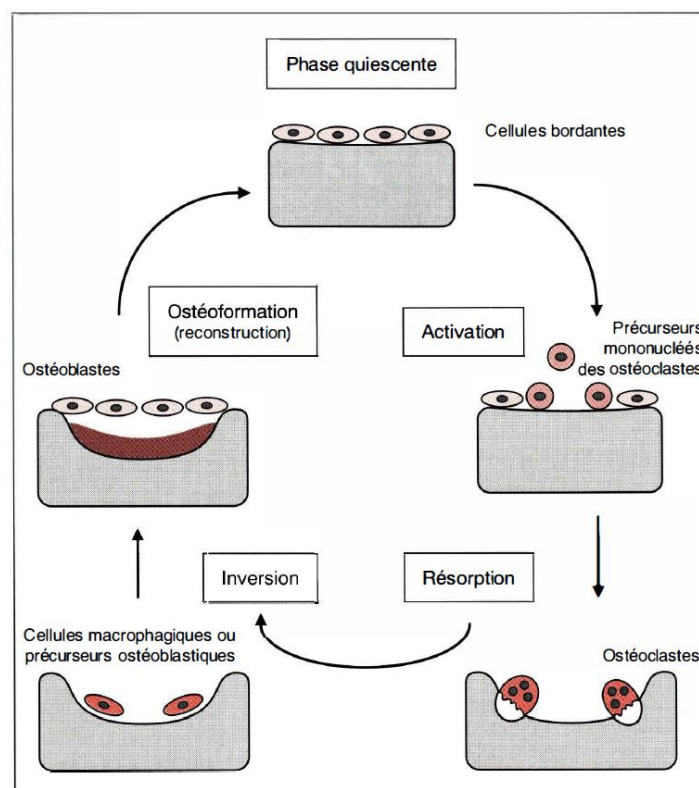
#### 4.4. Cellules osseuses

Plusieurs types cellulaires interviennent dans le métabolisme osseux pour remanier et consolider le tissu : les **cellules ostéoprogénitrices** séparées en quatre groupes cellulaires, les ostéoclastes, les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes (Barrère et al. 2008; Khurana et al. 2010; Ferreira et al. 2012; Jordana et al. 2017). Les ostéoclastes sont des cellules ostéorésorbantes dérivées des monocyte-macrophages de la lignée hématopoïétique. Les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes sont des cellules ostéoformatrices et dérivent des cellules-souches mésenchymateuses. Les **ostéoclastes** sont des cellules polynucléées (2-100 noyaux par cellule) de 100 µm de diamètre qui résorbent le tissu osseux. Les **ostéoblastes** sont des cellules cuboïdes mononucléées de 20-50 µm de diamètre qui synthétisent et minéralisent la matrice osseuse. Au fil de la synthèse et la minéralisation du tissu, les ostéoblastes perdent de leur activité et s'aplatissent pour devenir des ostéocytes incorporés dans la matrice extracellulaire, des cellules bordantes à la surface osseuse ou meurent par apoptose. Les **ostéocytes** représentent un dixième des ostéoblastes matures et sont intégrés dans la matrice minéralisée au sein de lacunes dans du liquide extracellulaire et sont interconnectés entre eux par des prolongements cytoplasmiques ainsi qu'avec les cellules de surface (ostéoblastes et cellules bordantes), ce qui permet la transmission d'informations chimiques et mécaniques. Les **cellules bordantes** forment une couche cellulaire aux rôles multiples : elles serviraient de barrière fonctionnelle pour séparer la moelle de l'os calcifié, participeraient à la communication intercellulaire, seraient une source d'ostéoblastes en dormance et pourraient réguler l'activité des ostéoclastes en sécrétant de substances chimiotactiques (Barrère et al. 2008; Khurana et al. 2010; Ferreira et al. 2012; Jordana et al. 2017).

#### 4.5. Remodelage osseux

Le tissu osseux est dynamique et en remodelage constant. Le remodelage osseux est réalisé par la résorption et le dépôt de matière osseuse en suivant quatre étapes principales (Vernejoul and Marie 1993; Aubin 2001; Hollinger et al. 2004; Khurana et al. 2010) telles que décrit dans la **Figure I.8** :

- La **phase d'activation**. Les cellules bordantes à la surface d'une travée osseuse se rétractent pour faire place aux ostéoclastes.
- La **phase de résorption**. Les ostéoclastes se fixent sur la matrice osseuse pour former une zone hermétique, acidifient la zone en libérant des ions  $H^+$  pour dissoudre la partie minérale osseuse et dégradent la partie organique sous l'action d'enzymes lysosomales libérées par exocytose dont l'activité est optimale grâce au pH acide. Des facteurs de croissance sont libérés par cette dégradation ce qui stimule la lignée ostéoblastique.
- La **phase d'inversion**. Des macrophages prennent la place des ostéoclastes pour nettoyer la lacune de résorption (ou lacune de Howship).
- La **phase de formation**. Les ostéoblastes produisent la matrice extracellulaire organique sous l'influence d'hormones (œstrogènes et androgènes), de la vitamine D et de facteurs de croissance fibroblastiques puis minéralisent la matrice grâce à l'ALP.



**Figure I.8.** Cycle du remodelage osseux. Source : Vernejoul and Marie (1993).

#### 4.6. Traumatismes osseux

Le tissu osseux a une haute capacité intrinsèque de remodelage en réponse aux micro-dommages du quotidien. L'équilibre entre résorption et formation de la matrice osseuse confère à l'os sa qualité. Cependant, ce dernier peut être perturbé en faveur de la résorption osseuse par un déficit en calcium, un régime alimentaire déséquilibré, un âge avancé ou une pathologie, ce qui fragilise l'os et entraîne des fractures, ou la nécessité de retirer chirurgicalement le tissu endommagé (Chaugule et al. 2017; Bergen et al. 2019; Koshi et al. 2019; Prasad 2021; Rico-Llanos et al. 2021; Zamani et al. 2021). Les pathologies associées aux os sont, par exemple, l'ostéoporose (diminution de la densité osseuse et modification de l'architecture de l'os spongieux), l'ostéosarcome (cancer osseux), l'ostéoarthrite (usure du cartilage articulaire par perte de souplesse et d'élasticité), et l'ostéomyélite (infection du tissu osseux) qui sont, pour la plupart, des maladies dégénératives dégradant les os (Khurana et al. 2010). L'ostéoporose touche 200 millions de personnes dans le monde et cause plus de 8,9 millions de fractures par an à la suite de chutes du quotidien, du fait de la fragilité des os (Johnell and Kanis 2006; Al Anouti et al. 2019; Prasad 2021). La réparation suite à une fracture va suivre plusieurs étapes naturelles, une inflammation initiale en réponse au traumatisme puis la formation d'un hématome, du cartilage et de l'os remodelé (Hollinger et al. 2004). Cependant, si la fracture est trop importante ou ouverte, une intervention chirurgicale est nécessaire avec le risque de complications associées. Une fracture ouverte entraîne une ostéomyélite dans 2 à 16% des cas (Chihara and Segreti 2010). Une ostéomyélite est une inflammation des os et des tissus associés, causée par une infection bactérienne. Elle peut arriver suite à une fracture ouverte ou une intervention chirurgicale, ainsi que par prolifération bactérienne depuis des tissus mous périphériques suite à un ulcère, une blessure pénétrante, une plaie ouverte ou une perte ischémique (Lew and Waldvogel 2004; Berendt et al. 2008; Chihara and Segreti 2010; Birt et al. 2017). L'infection au niveau de l'os entraîne le décollement du périoste et une prolifération des bactéries associée à la formation d'un séquestre osseux, une zone nécrosée par la perte de vascularisation et d'innervation. Si le séquestre s'étend sur une trop grande zone et que la réponse immunitaire ne suffit pas, le périoste va former du tissu osseux autour de ce dernier. Cette néoformation, l'involucre, permet de créer une continuité osseuse pour maintenir partiellement les fonctions osseuses (Berendt et al. 2008; Chihara and Segreti 2010; Rasigade 2012; Maffulli et al. 2016; Birt et al. 2017). Cependant, l'os infecté ainsi piégé au sein de l'involucre permet la prolifération bactérienne qui peut atteindre le système Haversien favorisant alors les infections ostéoarticulaires hématogènes (Rasigade 2012; Birt et al. 2017). En effet, ces infections résultent en une destruction locale de l'os, une nécrose et une apposition d'os néoformé (Birt et al. 2017). Les facteurs de risques liés à l'état de santé l'hôte sont le diabète, l'artériosclérose, l'alcoolisme, l'obésité, le tabagisme et le vieillissement (Birt et al. 2017). Les personnes atteintes de diabète sont



plus de 250 millions dans le monde et sont plus susceptibles d'être touchées par ce type d'infection, principalement au niveau des pieds à cause d'une insuffisance vasculaire ou d'une infection non détectée des tissus mous. Ils sont environ 20-25% à développer une ostéomyélite qui peut entraîner le besoin d'une amputation du membre dans 66% des cas suite à un ulcère du pied, si elle n'est pas traitée à temps (Lew and Waldvogel 2004; Berendt et al. 2008; Hartemann-Heurtier and Senneville 2008; Chihara and Segreti 2010).

#### 4.7. *Les thérapies osseuses*

Pour traiter ces infections osseuses, la procédure classique consiste généralement en un retrait chirurgical des tissus infectés et nécrosés, la mise en place d'un implant pour remplir la lacune osseuse et une prise d'antibiotiques pour éviter la prolifération bactérienne (Gitelis and Brebach 2002; Annamalai et al. 2019).

##### 4.7.1. *Utilisation des implants*

Les implants actuellement utilisés en régénération osseuse sont d'origines diverses et servent à la fois à combler les espaces osseux et à permettre le développement des cellules osseuses pour qu'elles assurent efficacement leur fonction régénératrice. Les implants peuvent être des greffes osseuses provenant du patient (autogreffe) ou d'un donneur (allogreffe). Les autogreffes ont l'avantage de ne déclencher aucune réaction immunitaire de rejet mais, comme les allogreffes, leur prélèvement se fait par chirurgie invasive ce qui peut entraîner des complications avec des infections et des morbidités du site donneur, de plus, les quantités de greffons sont limitées (Vats et al. 2003; Annamalai et al. 2019). Plus de 2 millions de greffes osseuses sont nécessaires chaque année au niveau mondial, ainsi des substituts à ces greffes ont été développés (Jordana et al. 2017; Rico-Llanos et al. 2021). Ces substituts osseux peuvent combler les lacunes, maintenir la forme du tissu et guider les cellules dans la zone traitée (Zhao et al. 2016). Ils peuvent être de nature inorganique comme les polymères de synthèse de type PMMA ou les céramiques phosphocalciques dont la composition est similaire à celle de la fraction minérale osseuse, par exemple (Birt et al. 2017). D'autres sont de nature organique comme ceux à base de collagène, mimant la trame organique des os, qui sont biocompatibles et biodégradables avec des propriétés mécaniques modulables et pouvant être combinés avec d'autres polymères (Barrère et al. 2008). En effet, en ingénierie tissulaire, il est important que les propriétés mécaniques soient similaires à celles du tissu remplacé ainsi que la structure interne du matériau (Zhao et al. 2016). Ces substituts peuvent être préalablement ensemencés avec des cellules afin d'accélérer et améliorer la régénération osseuse (Glowacki and Mizuno 2008). Certains traumatismes osseux comme les fractures ou nécroses peuvent causer des

dommages nerveux et vasculaires (Khurana et al. 2010). Ainsi, les implants idéaux doivent avoir des propriétés ostéoinductive (induire la régénération osseuse), ostéoconductive (soutenir la formation osseuse), ostéointégrative (entrer en contact avec le tissu vivant) et promouvoir la néovascularisation (Albrektsson and Johansson 2001; Annamalai et al. 2019).

#### 4.7.2. Utilisation de molécules thérapeutiques

A la suite des interventions chirurgicales pour la pose d'implant, il est nécessaire de suivre un traitement antibiotique car toute intervention invasive peut être une source externe d'infection bactérienne (Birt et al. 2017). Une infection non traitée peut causer une réduction de la régénération osseuse et ainsi prolonger la période d'hospitalisation et de rétablissement. Les bactéries communément responsables des ostéomyélites sont, dans plus de 50% des cas, des *Staphylococcus aureus* (80-90% des ostéomyélites pyogéniques) et des staphylocoques à coagulase négative tels que *Staphylococcus epidermidis*, présent dans le microbiote cutané pouvant contaminer le matériel médical. D'autres bactéries sont retrouvées occasionnellement dans plus de 25% des cas telles que des *Streptococcus* spp., des *Enterococcus* spp., des *Pseudomonas* spp., des *Enterobacter* spp. ou des *Escherichia coli* (Chihara and Segreti 2010; Maffulli et al. 2016; Birt et al. 2017). Afin de limiter la prolifération de ces bactéries, des antibiotiques sont administrés en prophylaxie majoritairement par voie intraveineuse. Le traitement peut durer plusieurs semaines voire des mois en cas d'infection (Gitelis and Brebach 2002). En effet, les bactéries responsables des ostéomyélites sont difficiles à éliminer car elles se fixent aux composants de la matrice osseuse (fibronectine, collagène ou sialoglycoprotéine osseuse), progressent profondément dans l'os en stimulant l'ostéolyse et forment du biofilm (Chihara and Segreti 2010; Birt et al. 2017). Le biofilm formé par les bactéries, est un microenvironnement qui favorise leur croissance et les isole des défenses immunitaires de l'hôte et des agents antibiotiques. C'est un complexe de polysaccharides qui encapsule les cellules bactériennes et les protège en limitant l'érosion mécanique, les infiltrations des cellules immunitaires et la diffusion des antibiotiques. Cette matrice de protection est un élément clé de la prolifération des staphylocoques en association avec l'activité anti-phagocytaire de leur protéine A membranaire (Lew and Waldvogel 2004; Chihara and Segreti 2010; Bazargani and Rohloff 2016; Birt et al. 2017). Ce facteur de virulence permet le développement de résistance aux antibiotiques en association avec la prolongation de l'antibiothérapie pour éliminer l'infection (Chihara and Segreti 2010; Birt et al. 2017).

#### 4.8. Les limites des traitements

Le traitement actuel associant la mise en place d'un implant et une antibiothérapie, présente plusieurs limites. Les implants inorganiques, tels que les céramiques donnent généralement des

résultats inférieurs aux greffes, du fait de l'absence de composants cellulaires, et d'autres comme les PMMA ne sont pas dégradables (Barrère et al. 2008; Annamalai et al. 2019). Les substituts organiques à base de collagène sont majoritairement développés à partir de collagènes terrestres de bœuf et de porc, ce qui soulève deux problèmes : le risque de zoonoses comme l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et les restrictions socio-culturelles (Arnesen and Gildberg 2007; Ferraro et al. 2010). De plus, les interventions chirurgicales pour implanter les substituts sont généralement invasives et peuvent entraîner des infections osseuses notamment car l'implant est rapidement recouvert d'adhésines ce qui favorise la fixation et la prolifération bactérienne (Berendt et al. 2008; Chihara and Segreti 2010; Birt et al. 2017). Les bactéries étant inaccessibles, les traitements antibiotiques doivent être prolongés, entraînant des risques de résistance et de colites infectieuses dues à l'impact néfaste sur le microbiote intestinal lorsque les antibiotiques sont administrés par voie orale ou intraveineuse (Birt et al. 2017).

## **5. STRATEGIE DEVELOPEE AU COURS DE LA THESE**

En réponse aux deux principales limites décrites précédemment, ce travail de thèse se positionne selon les deux grands axes de recherche suivants :

- 1 - Développer un biomatériau organique, biocompatible, biodégradable par la valorisation d'un collagène ne provenant pas de mammifères.
- 2 - Caractériser des molécules naturelles aux propriétés antibactériennes et/ou ostéogéniques par un procédé innovant écoresponsable.

### *5.1. Développement d'un biomatériau*

#### *5.1.1. Sources actuelles de collagène*

Le collagène et la gélatine utilisés dans le monde de l'industrie proviennent majoritairement (> 98%) de la peau, des tendons, des os et des sabots de mammifères terrestres, comme le porc et le bœuf (Ferraro et al. 2010; Ehrlich 2015; Silvipriya et al. 2015; Nitsuwat et al. 2021). L'extraction suit classiquement plusieurs étapes (Barnes et al. 2007; Silvipriya et al. 2015; Ahmad et al. 2017; Bhagwat and Dandge 2018; Cheng et al. 2019) : un prétraitement de la matière première, ainsi que le retrait du matériel non-collagénique grâce à des sels ; la déminéralisation à l'acide chlorhydrique ou acétique ; la digestion par des acides ou des enzymes (e.g. pepsine) ; l'extraction thermique ; une purification éventuelle (filtration, dialyse ou chromatographie) ; et le séchage par lyophilisation. Les paramètres d'extraction ont un impact sur les propriétés mécaniques, la stabilité thermique et la dégradabilité du collagène (Zeng et al. 2012; Cheng et al. 2019). En effet, le type de prétraitement impactera le produit

final avec des collagènes acido-solubles ou pepsino-solubles, c'est également le cas pour la gélatine. L'utilisation d'un processus acide pour extraire la gélatine conduira à l'obtention de gélatine de type A avec un point isoélectrique de pH 6-9, alors qu'un processus alcalin donnera une gélatine de type B avec un point isoélectrique de pH 4,8-5,5 (Jongjareonrak et al. 2006; Liu et al. 2020).

Les collagènes provenant de mammifères terrestres sont avantageés pour l'ingénierie tissulaire car leurs propriétés mécaniques et thermiques sont comparables à celles du collagène humain. Cependant, en raison de freins sanitaires avec la crainte de zoonoses par la transmission de vecteurs pathogènes tels que le prion responsable de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB ou vache folle), et de freins socio-culturels pour certaines communautés musulmanes ou juives (jusqu'à 23% de la population) avec le besoin de produits kasher et halal, de nouvelles sources alternatives de collagène et gélatine sont nécessaires (Jongjareonrak et al. 2006; Bae et al. 2008; Ferraro et al. 2010; Silvipriya et al. 2015; Bhagwat and Dandge 2018; Huang et al. 2019; Nitsuwat et al. 2021).

### 5.1.2. Source alternative de collagène

Actuellement, le collagène d'origine marine représente une faible part (< 2%) de la production totale de collagène (Ferraro et al. 2010; Ehrlich 2015). Cependant, avec l'augmentation de l'aquaculture, la quantité de coproduits riches en collagène générée ne fait qu'augmenter soulevant des besoins de la gestion de ces biomasses (Caruso et al. 2020; FAO 2020). A cela, s'ajoute depuis plusieurs années, des études montrant le potentiel des collagènes marins en tant que biomatériaux en ingénierie tissulaire : l'éponge *Ircinia fusca* pour les os (Pallela et al. 2012), les méduses *Stomolophus meleagris* (Song et al. 2006), *Rhopilema esculentum* (Bermueller et al. 2013; Hoyer et al. 2014) et *Rhizostoma pulmo* pour le cartilage (Pugliano et al. 2017), les calamars *Dosidicus gigas* pour servir d'agent plastifiant (Uriarte-Montoya et al. 2010) et *Kondakovia longimana* (Coelho et al. 2017), ou encore les poissons *Hypophthalmichthys molitrix* (Chen et al. 2014), *Paralichthys olivaceus* pour la peau (Chandika et al. 2015), *Prionace glauca* pour les os (Elango et al. 2016; Diogo et al. 2018), et d'autres sources animales (Silvipriya et al. 2015; Lv et al. 2019; Subhan et al. 2020). Le collagène marin, notamment, celui issu des poissons, est généralement obtenu à partir des coproduits de l'industrie alimentaire comme la peau, les arêtes ou les écailles, l'ensemble des coproduits pouvant représenter jusqu'à 75% du poids de l'animal selon l'espèce (Bae et al. 2008; Chen et al. 2014; Bhagwat and Dandge 2018; Subhan et al. 2020; Liu et al. 2022). Ces coproduits sont souvent utilisés en tant qu'aliments (farines) avec une faible valeur ajoutée pour nourrir d'autres animaux. Or la peau et les os contiennent 30% de collagène, ce qui en font des sources non-négligeables de collagène (Ahmad et al. 2010; Bhagwat and Dandge 2018; Subhan et al. 2020). La valorisation de ces coproduits marins est donc bénéfique pour l'environnement en réduisant le gaspillage de ces ressources, et la pollution associée

à leur évacuation ou leur incinération. De plus, la création de produits à haute valeur ajoutée pour le secteur biomédical augmente le rendement économique de cette industrie dans une vision d'économie circulaire où la valeur des produits, des matériaux et des ressources est maintenue dans l'économie aussi longtemps que possible, en minimisant la production de déchets (Silvipriya et al. 2015; Huang et al. 2019; Subhan et al. 2020; Nitsuwat et al. 2021). Le collagène marin a une image plus sûre dans l'esprit des consommateurs, par l'absence de risque de zoonoses, de contaminants biologiques ou toxines et de contraintes socio-culturelles. De plus, il est biocompatible, et son poids moléculaire est inférieur à celui du collagène terrestre, ce qui lui donne un meilleur taux d'absorption avec moins de réponses inflammatoires et immunitaires (Chen et al. 2014; Silvipriya et al. 2015; Bhagwat and Dandge 2018; Huang et al. 2019; Lim et al. 2019; Subhan et al. 2020). Malgré ces avantages, les résistances thermiques et mécaniques du collagène marin sont un obstacle pour son utilisation en ingénierie tissulaire car elles sont plus faibles que celles de leurs homologues provenant des mammifères (Jongjareonrak et al. 2006; Mohtar et al. 2011; Cheng et al. 2019). Les collagènes terrestres et marins ont des compositions différentes en termes de ratio d'acides aminés, ce qui entraîne des différences dans les propriétés mécaniques et fonctionnelles, même entre différentes espèces de poissons marins (Gómez-Guillén et al. 2002; Gómez-Estaca et al. 2009; Bode et al. 2011; Da Silva et al. 2014; Huang et al. 2019; Subhan et al. 2020) (**Tableau I.2**). En effet, la teneur en acides aminés tels que la Proline et l'Hydroxyproline est généralement inférieure dans le collagène marin (surtout si l'organisme est originaire des eaux froides), ce qui réduit la stabilité des brins triples hélices car il y a moins de liaisons intramoléculaires (Jongjareonrak et al. 2006; Ferraro et al. 2010; Mohtar et al. 2013).

**Tableau I.2.** Propriétés physiques typiques de différentes gélatines. Adapté de Haug and Draget (2011).

Propriété	Gélatine de mammifère	Gélatine de poisson d'eau chaude	Gélatine de poisson d'eau froide
Température de gélification	26-27°C	21-22°C	4-8°C
Température de fusion	33-34°C	28-29°C	14-16°C
Solubilité	> 40°C	> 35°C	> 22°C
Teneurs en Proline et Hydroxyproline	21.9%	19.8%	15.6%

### 5.1.3. Techniques de réticulation

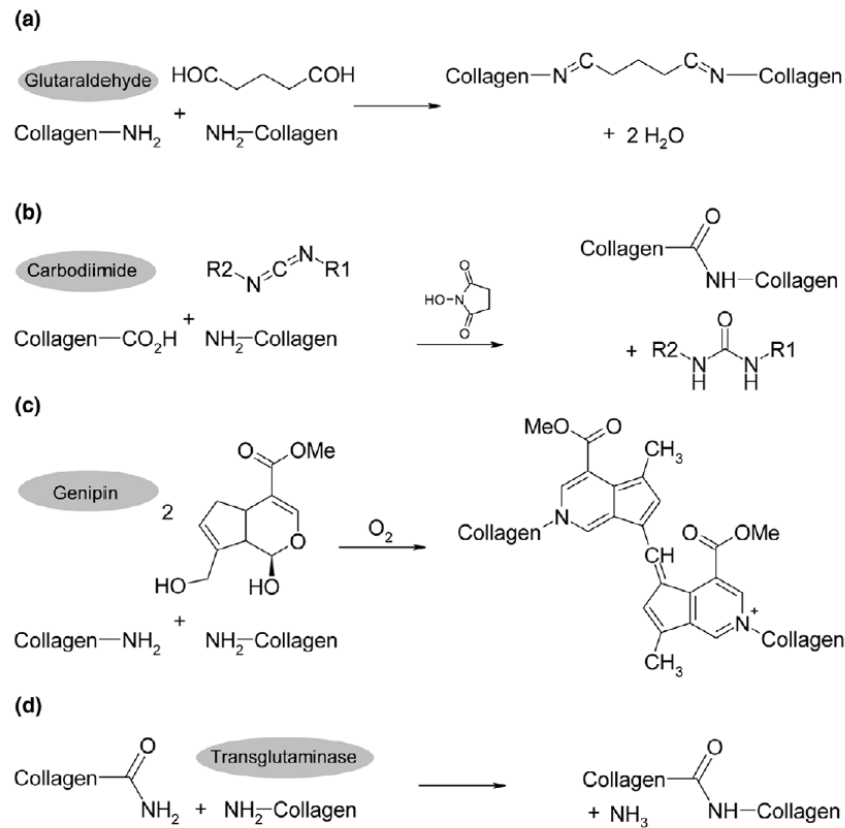
Les performances, notamment rhéologiques, du collagène (terrestre ou marin) peuvent être modifiées par le processus de réticulation. La réticulation consiste à modifier le réseau protéique par la formation de nouvelles liaisons covalentes afin d'augmenter la résistance, l'élasticité et la stabilité du matériau (Zhao et al. 2016). Plusieurs techniques de réticulation sont applicables au collagène, et sont séparées en trois catégories : chimique, physique et enzymatique (Bello et al. 2020; Rico-Llanos et al. 2021) (Tableau I.3).

**Tableau I.3.** Principales méthodes de réticulation du collagène. Source : Rico-Llanos et al. (2021).

	Type of Crosslinking	Main Characteristics
Chemical	Glutaraldehyde (GA)	Low cost. High reactivity. High water solubility. Cytotoxic.
	Genipin	Less toxic than other chemical crosslinkers. Might promote osteoblastic differentiation. Not suitable for gelatin crosslinking.
	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS).	Zero-length crosslinker. Acts mainly as an intra-fibrillar crosslinker. Low cytotoxicity.
	Dialdehyde starch	Can be used for intra- and intermolecular crosslinking. Low cytotoxicity. Biodegradable. Has antiviral activity.
	Chitosan	Biodegradable. Non-toxic. Has antibacterial and antifungal activity. Poor water solubility. Tends to form polydisperse solutions.
Physical	Dehydrothermal (DHT) treatment	Non-toxic. Provides sterilization. May cause collagen denaturation.
	UV light	Faster than DHT. Non-toxic. Provides sterilization. May cause collagen denaturation.
Enzymatic	Microbial transglutaminase	Similar to natural crosslinking. More expensive.

Actuellement, la **réticulation chimique** est la plus utilisée avec des substances comme le glutaraldéhyde (GTA), la génipine, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC), le N-hydroxysuccinimide (NHS) ou encore le glycérol (Drury and Mooney 2003; Adamiak and Sionkowska 2020; Sundar et al. 2020). Le plus utilisé est le GTA car il est soluble dans l'eau, peu coûteux et très efficace, il s'intercale entre les chaînes de collagène pour former des liaisons covalentes (Sundar et al. 2020) (Figure I.9). Le GTA diminue la solubilité du collagène dans l'eau et améliore ses propriétés mécaniques ; cependant, ce produit présente des effets négatifs par sa faible biocompatibilité ainsi que sa cytotoxicité pouvant induire l'apoptose et la calcification des tissus (Charulatha and Rajaram

2003; Drury and Mooney 2003; Elango et al. 2017; Sundar et al. 2020). Les autres substances citées ont une biocompatibilité supérieure à celle du GTA. Cependant, elles peuvent être toxiques pour la santé humaine et ne peuvent donc pas être utilisées pour l'alimentation humaine ou la médecine, par exemple (Charulatha and Rajaram 2003; Yi et al. 2006).

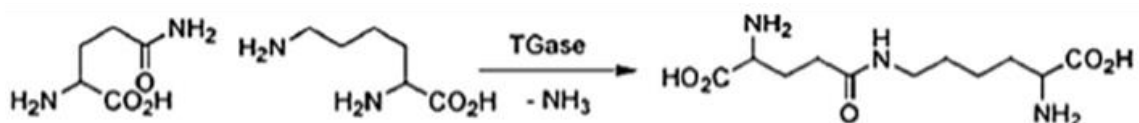


**Figure I.9.** Schéma des réactions de réticulation du collagène selon les réactifs employés. (a) Le glutaraldéhyde se lie de manière covalente aux groupes amines, mais peut également se lier à d'autres molécules de glutaraldéhyde. (b) Le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et le N-hydroxysuccinimide (NHS) catalysent les liaisons covalentes entre les groupes acides carboxyliques et les groupes amines ; ainsi, la réticulation entre les structures de collagène est possible. En outre, d'autres composants de la matrice extracellulaire contenant des groupes carboxyles, tels que les glycosaminoglycanes, peuvent également être réticulés. (c) La génipine réagit de manière similaire au glutaraldéhyde, mais ne peut se lier qu'à une seule autre molécule de génipine. (d) La transglutaminase est une enzyme très spécifique qui catalyse la réticulation du collagène entre la lysine et la glutamine dans les structures de collagène avec la libération d'ammoniac. Source : Englert et al. (2007).

La **réticulation physique** est la moins utilisée. Elle consiste à appliquer des traitements déhydrothermiques (DHT) ou une photo-oxydation par radiations UV pour former des liaisons de faible énergie. Cette technique offre une haute biocompatibilité du collagène modifié en évitant la formation de résidus cytotoxiques. Le collagène qui en résulte est facilement dégradable ce qui peut être un

avantage comme un désavantage en fonction de l'application souhaitée (Bhat and Karim 2009; Zeugolis et al. 2009; Stachel et al. 2010; Sundar et al. 2020). Cependant, le traitement physique ne permet généralement pas une réticulation suffisante pour les applications en ingénierie tissulaire, c'est pourquoi le traitement chimique est dominant (Sundar et al. 2020).

Afin d'éviter les risques liés à l'utilisation de la réticulation par GTA, la **réticulation enzymatique** voit son étude et son utilisation augmenter. Les enzymes utilisées sont la transglutaminase (TG), la laccase, la tyrosinase et la lysyl-oxydase (LOX) (Adamiak and Sionkowska 2020; Bello et al. 2020). La TG (EC.2.3.2.13) est l'enzyme la plus utilisée pour réticuler le collagène. La TG est une amine- $\gamma$ -glutamyl transférase retrouvée dans presque tous les organismes vivants comme chez l'humain où elle intervient notamment dans la kératinisation épidermique, la coagulation sanguine, la régulation des membranes des érythrocytes ou la détoxification du foie (Chen et al. 2005; Bode et al. 2011). Elle est également produite par des microorganismes, à la différence que cette transglutaminase microbienne (MTG) est calcium indépendante contrairement à la TG humaine. Par ailleurs, elle peut être produite en grande quantité par la culture de *Streptomyces mobaraensis* (Bode et al. 2011). Par comparaison avec la réticulation chimique, les avantages de la réticulation enzymatique par MTG sont nombreux : elle est hautement cytocompatible, écoresponsable, biodégradable, efficace et de qualité alimentaire pour l'humain depuis 1998 (Huang et al. 2019; Adamiak and Sionkowska 2020; Liu et al. 2020). Cette enzyme catalyse la formation de liaisons covalentes entre les résidus de Glutamine (donneurs d'acyle) et, généralement, les groupes  $\epsilon$ -amino des résidus de Lysine (accepteur d'acyle), ainsi, des liaisons isopeptidiques  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)-Lys intra- et intermoléculaires sont formées, ce qui améliore la stabilité thermique et la résistance du collagène (Folk 1970; Chen et al. 2005; Alves Macedo et al. 2010; Stachel et al. 2010; Cheng et al. 2019; Liu et al. 2020) (Figure I.10). Son utilisation est répandue, notamment dans l'industrie alimentaire pour améliorer la texture, la solubilité des protéines, l'émulsification, le moussage ou la viscosité (Cheng et al. 2019). Plusieurs études rapportent son utilisation pour former des biomatériaux à base de collagène de mammifères (Chen et al. 2003, 2005; Broderick et al. 2005; Chau et al. 2005; Chambi and Grosso 2006; Yang et al. 2016; Cheng et al. 2019; Liu et al. 2020) et de collagène marin (Bode et al. 2011; Da Silva et al. 2014; Elango et al. 2017; Huang et al. 2019; Liu et al. 2022).



**Figure I.10.** Réticulation enzymatique des résidus de Glutamine et Lysine menant à une nouvelle liaison peptidique. Source : Bode et al. (2011).



Dans ce travail thèse, nous avons choisi de développer la méthode de réticulation enzymatique par MTG sur du collagène marin pour concurrencer la réticulation par voie chimique avec du GTA, afin de limiter les risques de cytotoxicité pour les applications ciblées.

#### 5.1.4. Collagène marin candidat de ces travaux

Le collagène sélectionné pour ces travaux de thèse est le collagène de type I de la peau du saumon atlantique (*Salmo salar* L., 1758). Il a été choisi car il présente tous les avantages du collagène marin précédemment exposés et il est disponible en grande quantité grâce à la demande croissante de saumon par les consommateurs. La production mondiale de saumon est de 2,4 millions de tonnes par an, soit 4,5% de la production aquacole de poissons (FAO 2020). De plus, provenant de l'industrie alimentaire, ce collagène offre une pérennité, une constance et une traçabilité de la ressource. Depuis une vingtaine d'années, d'autres études se sont intéressées au collagène de saumon pour connaître sa structure et ses caractéristiques (Arnesen and Gildberg 2007; Díaz et al. 2011; Moreno et al. 2012), pour déterminer l'impact des procédés d'extraction (Díaz-Calderón et al. 2017), pour développer des applications dans les domaines médicaux en tant que matrice, greffe vasculaire, agent de surface ou pansement cutané (Nagai et al. 2004, 2008, 2009; Acevedo et al. 2019), et pour tester la réticulation chimique (Yunoki et al. 2004; Hoyer et al. 2012). A notre connaissance, seule la thèse de Provost (2016) s'est intéressée à une étude préliminaire de la réticulation enzymatique par MTG de ce collagène.

Ce premier axe de recherche est développé dans le **chapitre II** de cette thèse sous la forme d'un article scientifique et de compléments pour répondre aux questions scientifiques suivantes :

- Est-il possible de modifier les propriétés physiques et structurelles d'un collagène de saumon par réticulation enzymatique à l'aide de la transglutaminase microbienne (MTG) ?
- La réticulation enzymatique peut-elle concurrencer la réticulation chimique dans l'amélioration des propriétés mécaniques et structurelles du collagène de saumon ?
- Le collagène de saumon est-il comparable au collagène de mammifère après réticulation ?
- Quels sont les paramètres de réticulation enzymatique optimaux pour obtenir un biomatériau à base de collagène de saumon pouvant aider à la régénération tissulaire osseuse ?

## 5.2. *Caractérisation des molécules*

Le tissu osseux peut être touché par des infections complexes à éliminer en raison des mécanismes de défense mis en place par les bactéries pathogènes, comme la formation de biofilms. Ces biofilms sont un des facteurs responsables de la virulence de ces bactéries et de l'apparition de résistance face aux traitements antibiotiques conventionnels. La recherche de nouveaux composés antibactériens est donc nécessaire pour pallier cette adaptation des bactéries (Zolotareva et al. 2019). De plus, le tissu osseux pouvant être fragilisé par ces infections, l'ajout de composés ostéogéniques serait bénéfique pour améliorer et accélérer le rétablissement du patient. Ces molécules actives peuvent être retrouvées dans différents organismes, comme les végétaux marins (Li et al. 2011; Zolotareva et al. 2019; Gager et al. 2020).

### 5.2.1. *Composés bioactifs de végétaux marins*

Les végétaux marins (microalgues, macroalgues et plantes halophiles) sont reconnus comme une source durable et importante de composés bioactifs. En effet, ils synthétisent de nombreux composés qui participent à leurs métabolismes primaire et secondaire. Le métabolisme primaire comprend notamment des protéines, glucides, lipides, acides gras et vitamines ; l'ensemble de ces molécules sont essentielles au fonctionnement de l'organisme, alors que, le métabolisme secondaire regroupe des composés qui jouent un rôle secondaire mais dont l'activité associée est souvent importante. Ces métabolites secondaires sont connus pour être dotés de propriétés antifongiques, antivirales ou encore antibiotiques (Zolotareva et al. 2019). Les végétaux marins sont soumis à des stress multiples associés à leur vie fixée : des stress abiotiques tels que la salinité, la dessiccation ou les radiations UV, et des stress biotiques tels que la compétition, la prédation, l'épiphytisme ou la contamination par des pathogènes. Ces stress sont des facteurs qui perturbent la croissance, la survie ou encore la reproduction des organismes concernés (Davison and Pearson 1996; Connan et al. 2004; Plouguerné et al. 2008; Onofrejevová et al. 2010; Flores-Molina et al. 2014; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Le Lann et al. 2016; Lalegerie et al. 2020). Afin de contrer ces stress, les végétaux marins ont développé des mécanismes de protection pour réduire les impacts physiologiques et survivre, en s'adaptant par la production de métabolites secondaires de défense/protection (Li et al. 2011; Le Lann et al. 2012b, 2016; Creis 2015). Parmi la multitude de métabolites secondaires produits dans le règne végétal, nous nous sommes intéressés aux composés phénoliques ou polyphénols, une des principales familles synthétisées par les végétaux marins.

### 5.2.2. Structure des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des molécules caractérisées par la présence d'un noyau aromatique de type benzène (C6) associé à des groupements hydroxyles. Cette large définition intègre de nombreux composés avec une diversité de structures, de polarités et d'activités. Actuellement, plus de 8000 molécules sont connues chez les végétaux depuis la structure la plus simple composée d'un noyau phénol comme l'hydroquinone ou le phloroglucinol, jusqu'à des structures complexes ramifiées comme les flavonoïdes et les phlorotannins (Grassmann et al. 2002; Audibert et al. 2010; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Cotas et al. 2020; Del Mondo et al. 2021). Les composés phénoliques sont divisés en quatre catégories (Dai and Mumper 2010; Alara et al. 2021) (**Figure I.11**) :

- Les **acides phénoliques** (C6-C1) sont des molécules simples avec deux sous-groupes connus, les dérivés de l'acide benzoïque comme l'acide gallique, et les dérivés de l'acide cinnamique tels que les acides coumarique, caféique et férulique.
- Les **flavonoïdes** (C6-C3-C6) sont caractérisés par un noyau flavane avec six sous-groupes (flavones, flavanones, flavonols, flavanols, anthocyanines et isoflavones) et sont principalement présents chez les végétaux terrestres (Dai and Mumper 2010; Tanniou et al. 2013; Alara et al. 2021).
- Les **stilbènes** (C6-C2-C6) sont des composés minoritaires principalement représentés par le resvératrol (*non illustré ici*).
- Les **tannins** sont divisés en deux sous-groupes, les tanins condensés à base de flavan-3-ol, et les tanins hydrolysables dérivés de l'acide gallique et du glucose pour la lignée verte, et à base de phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzène) pour les algues brunes, appelés phlorotannins (Audibert et al. 2010; Dai and Mumper 2010; Tanniou et al. 2013; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Alara et al. 2021). Les phlorotannins sont des composés retrouvés exclusivement chez les algues brunes (Phaeophyceae) pouvant représenter jusqu'à 15-25% de leur biomasse sèche selon les espèces (Koivikko et al. 2007; Zolotareva et al. 2019). Ces phlorotannins sont séparés en quatre sous-classes principales selon les liaisons entre les unités phloroglucinol : les fucols avec une liaison aryl-aryle, les fuhals et phloréthols avec une liaison éther, les fucophloréthols avec les deux liaisons précédentes, et les eckols et carmalols avec une liaison dibenzodioxine, non trouvés dans les plantes terrestres (Cérantola et al. 2006; Singh and Bharate 2006) (**Figure I.12**). Ils possèdent un large éventail de structures selon leur degré de polymérisation allant d'une structure simple à une structure ramifiée avec des poids moléculaires entre 126 et 650 kDa (Zolotareva et al. 2019).

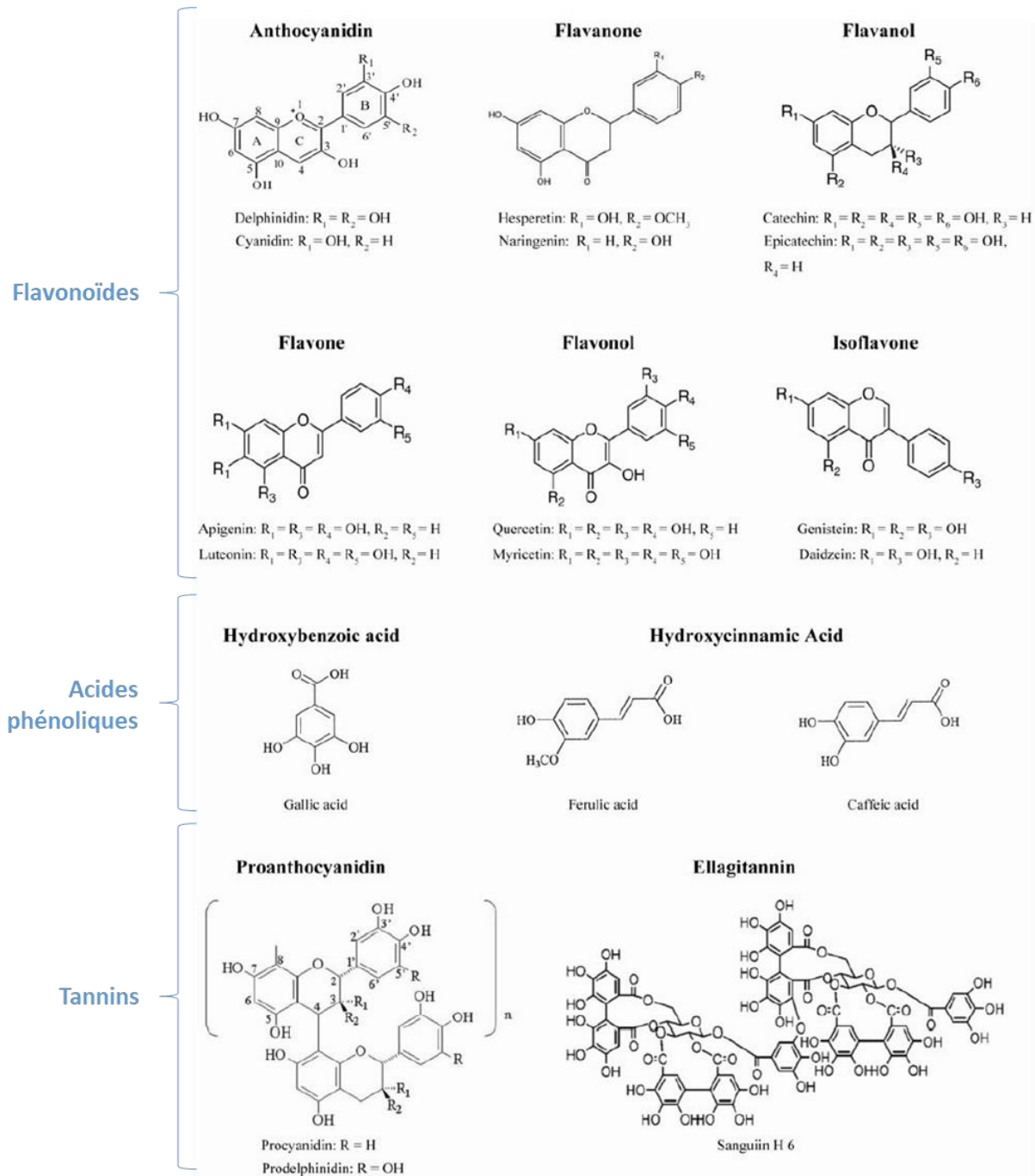


Figure I.11. Structures des flavonoïdes, acides phénoliques et tannins. Adapté de Dai and Mumper (2010).

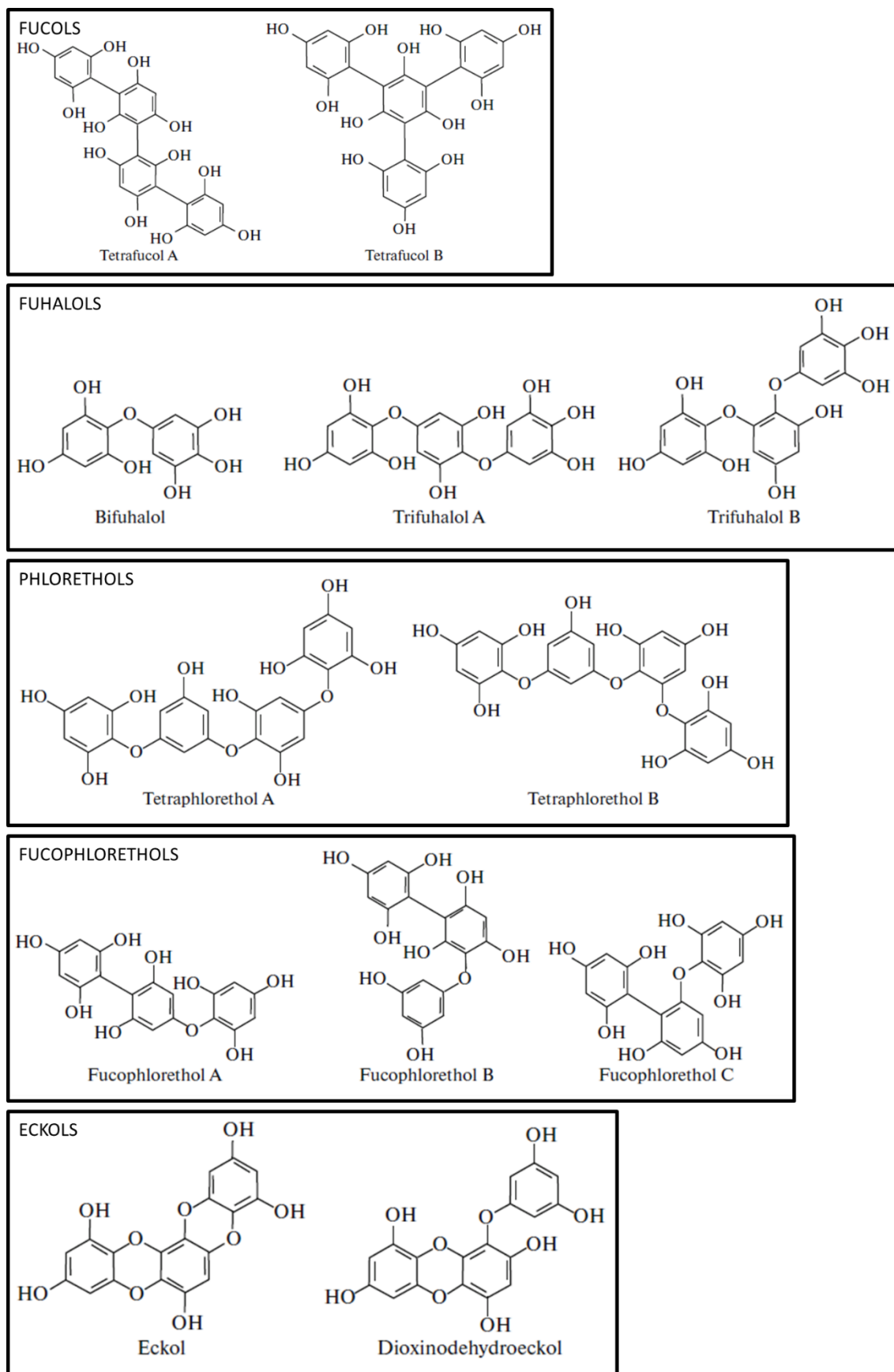


Figure I.12. Structures des phlorotannins. Adapté de Imbs and Zvyagintseva (2018).

### 5.2.3. Fonctions des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont ubiquitaires dans les tissus variés des végétaux et jouent plusieurs rôles au sein de l'organisme :

- **Rôle structurel** : ils sont impliqués dans l'élaboration du ciment adhésif et dans la formation de la paroi cellulaire où ils sont concentrés sous des formes insolubles comme constituant biologiquement actif ou dans des vésicules cellulaires (physodes) sous des formes solubles et polaires (Schoenwaelder and Clayton 1999; Connan et al. 2004; Abdala-Díaz et al. 2006; Zolotareva et al. 2019).
- **Rôle reproducteur** : ils permettent la coloration des fleurs afin d'attirer les pollinisateurs (Lone et al. 2020).
- **Rôle compétiteur** : certains composés sont sous forme volatile afin d'affecter la croissance des individus à proximité (Lone et al. 2020).
- **Rôle protecteur** : ils interviennent dans la protection face aux radiations UV nocives en absorbant une partie du spectre des UVB, dans la dissuasion des prédateurs en étant astringents, toxiques et inhibiteurs d'enzymes digestives, dans la résistance aux agents pathogènes ainsi que dans la régulation du stress oxydant (Connan et al. 2004; Stiger et al. 2004; Plouguerné et al. 2008; Onofrejová et al. 2010; Le Lann et al. 2012b, 2016; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Imbs and Zvyagintseva 2018; Lalegerie et al. 2020).

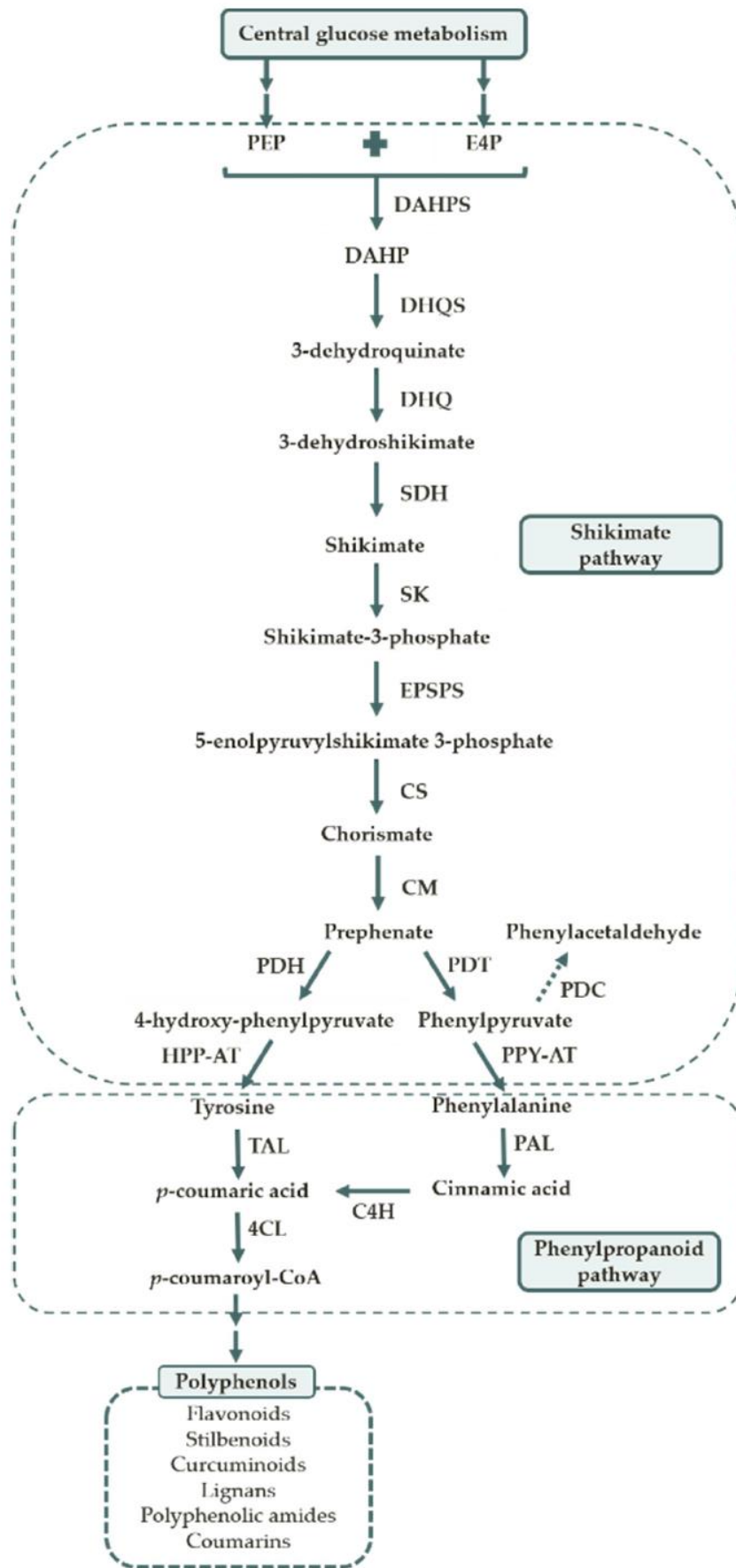
Les composés phénoliques servent à la protection des végétaux notamment de par leur fort potentiel antioxydant. Ils interviennent dans la détoxification de molécules formées au cours de stress, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou l'oxygène singulet (Zolotareva et al. 2019). Ces ROS sont produits au cours de la photosynthèse et la respiration mitochondriale par le transport des électrons (Mallick and Mohn 2000; Zolotareva et al. 2019). Les ROS sont des donneurs et accepteurs d'électron qui peuvent interagir avec certaines biomolécules causant l'altération ou la désactivation d'activités biochimiques. Ces perturbations peuvent conduire à des dommages biologiques sur des molécules comme les acides nucléiques (*e.g.* ADN et ARN) ou les lipides membranaires (Mallick and Mohn 2000; Dai and Mumper 2010). Les ROS sont naturellement produits par la cellule et sont utiles au fonctionnement cellulaire en tant que signaux cellulaires impliqués dans diverses réponses physiologiques, il existe un équilibre entre la formation et l'élimination de ces derniers pour limiter les dommages cellulaires (Flores-Molina et al. 2014). La formation de ROS est stimulée par de nombreux stress environnementaux tels que la dessiccation, la variation de la salinité, la variation de la température, la quantité et la qualité de la lumière solaire, le rayonnement UV ou des

facteurs biotiques comme vu précédemment (Mallick and Mohn 2000; Grassmann et al. 2002; Connan et al. 2006; Li et al. 2011). Chaque facteur peut conduire à une surproduction de ROS et si la cellule ne peut pas les éliminer efficacement, le déséquilibre s'amorce ainsi que les dommages cellulaires associés, c'est le stress oxydant (Mallick and Mohn 2000; Dai and Mumper 2010). Les composés phénoliques agissent comme des antioxydants qui permettent la désactivation des ROS. En effet, grâce à leur structure moléculaire, ils peuvent donner un atome d'hydrogène ou un électron au ROS depuis leur groupe hydroxyle ou délocaliser un électron non-apparié via leur système aromatique (Dai and Mumper 2010; Zolotareva et al. 2019). Ainsi, une accumulation de composés phénoliques dans les cellules végétales peut traduire une réponse à un stress physiologique (Zolotareva et al. 2019).

#### 5.2.4. Biosynthèse des composés phénoliques

La production de composés phénoliques dépend de facteurs externes et internes comme le degré de stress, la localisation, le statut reproductif, la période du cycle de vie ou la partie de l'organisme (Connan et al. 2004; Stiger et al. 2004; Plouguerné et al. 2008; Le Lann et al. 2012a). De nombreuses études présentent une corrélation entre l'augmentation de la production de composés phénoliques et une température ou une activité antioxydante plus élevée, ce qui confirme le rôle protecteur des composés phénoliques dans ces conditions (Abdala-Díaz et al. 2006; Le Lann et al. 2012b). La qualité et la quantité des composés phénoliques dépendent de l'espèce et fluctuent au cours d'une journée et d'une saison à l'autre (Connan et al. 2004; Gager et al. 2020). La biosynthèse des composés phénoliques des végétaux terrestres débute par la voie de l'acide shikimique qui produit les précurseurs des composés phénoliques : la phénylalanine et la tyrosine (Rosa et al. 2019; Santos-sánchez et al. 2019; Rainha et al. 2020).

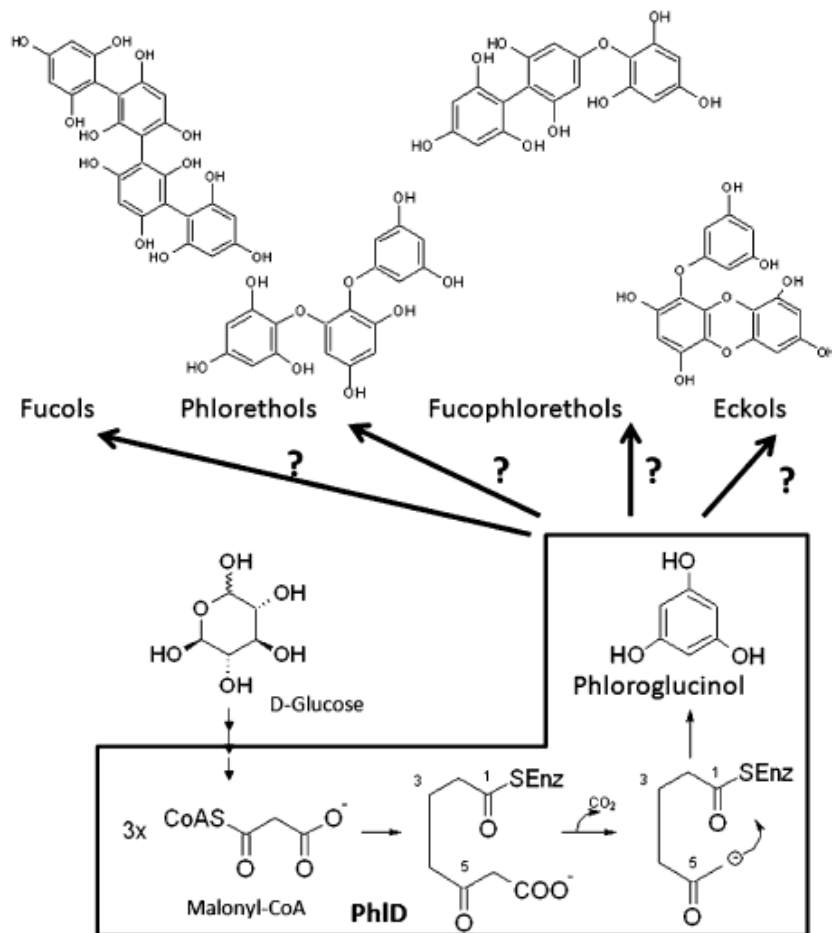
La **voie de l'acide shikimique** produit les précurseurs du métabolisme phénylpropanoïdes (**Figure I.13**). Les précurseurs de cette voie sont l'érythrose-4-phosphate (E4P) issu de la voie des pentoses phosphates et le phosphoénolpyruvate (PEP) issu de la voie glycolytique. Ces deux molécules se condensent en 3-déoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) par l'activité de l'enzyme DAHP synthase. Par la suite, le phosphate et l'eau sont libérés grâce à deux réactions enzymatiques successives, pour former l'acide 3-déhydroshikimique (3-DHS) qui est notamment le précurseur de l'acide gallique. Une réaction d'hydrogénation catalysée par la shikimate déshydrogénase transforme le 3-DHS en acide shikimique. L'intermédiaire suivant est le chorismate qui subit un réarrangement de sa chaîne aliphatique, une transamination et une déshydratation pour produire de la phénylalanine et de la tyrosine. Ces deux acides aminés sont les principaux substrats de la synthèse des composés phénoliques par la voie des phénylpropanoïdes.



**Figure I.13.** Voies impliquées dans la biosynthèse des polyphénols. PEP: phosphoenolpyruvic acid; E4P: D-erythrose- 4-phosphate; DAHPS: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase; DAHP: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate; DHQS: 3-dehydroquinate synthase; DHQ: 3-dehydroquinate dehydratase; SDH: shikimate dehydrogenase; SK: shikimate kinase; EPSPS: 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase; CS: chorismate synthase; CM: chorismate mutase; PDH: prephenate dehydrogenase; PDT: prephenate dehydratase; PDC: phenylpyruvate decarboxylase; HPP-AT: 4-hydroxyphenylpyruvate aminotransferase; PPY-AT: phenylpyruvate aminotransferase; TAL: tyrosine ammonia lyase; PAL: phenylalanine ammonia lyase; C4H: cinnamate-4-hydroxylase; 4CL: 4-coumarate-CoA ligase. Source : Rainha et al. (2020).



Les mécanismes de biosynthèse des composés phénoliques exclusifs aux algues, comme les phlorotannins, ne sont pas totalement élucidés à ce jour. Certains auteurs ont émis l'hypothèse d'une synthèse par le métabolisme du shikimate; cependant, il semblerait que le mécanisme acétate-malonate soit plus cohérent (Zolotareva et al. 2019). Ainsi, les phlorotannins seraient synthétisés dans les chloroplastes ou le réticulum endoplasmique par catalyse de la polyketide synthase de type III (Figure I.14) (Targett and Arnold 1998; Meslet-Cladière et al. 2013).



**Figure I.14.** Voie de biosynthèse potentielle du phloroglucinol par une PKS bactérienne de type III (PhID) chez *Pseudomonas fluorescens* à partir du malonyl-coA comme seul substrat (zone encadrée). Les étapes de la condensation du phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzène) ne sont pas connues, et seule la synthèse du phloroglucinol à partir de la voie de l'acétate-malonate a fait l'objet d'une hypothèse par un processus qui pourrait impliquer un complexe enzymatique de type polyketide synthase chez les algues brunes. Source : Meslet-Cladière et al. (2013).

### 5.2.5. Potentiel médical

L'importante diversité chimique des composés phénoliques est associée à de nombreuses activités biologiques dont le potentiel pour la santé humaine a souvent été étudié. En effet, les composés phénoliques possèdent un large éventail de propriétés, ils sont notamment antioxydants, antitumoraux, anti-inflammatoires, antifouling, antifongiques, antibactériens et antiviraux (Zubia et al. 2009; Onofrejevá et al. 2010; Li et al. 2011; Rajauria et al. 2013; Desbois and Smith 2015; Heffernan et al. 2015; Le Lann et al. 2016; Cotas et al. 2020; Del Mondo et al. 2021; Jimenez-Lopez et al. 2021). Dans le domaine de la santé, ils peuvent être utilisés en tant qu'inhibiteurs d'enzymes. La revue de littérature de Li et al. (2011) met en avant le pouvoir inhibiteur des composés phénoliques sur l' $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$ -amylase réduisant l'absorption du glucose par l'intestin grêle et donc sa présence dans le sang ; sur l'enzyme de conversion de l'angiotensine permettant de diminuer la quantité d'angiotensine II, un vasoconstricteur à l'origine de l'hypertension artérielle ; ou encore sur la métalloprotéinase matricielle qui joue un rôle dans la dégradation des composés extracellulaires souvent associée à des inflammations chroniques comme l'arthrite ou l'ostéoporose. De plus, leur haut pouvoir antioxydant est un atout pour les utiliser afin de prévenir le développement de maladies causées par le stress oxydant telles que l'ostéoporose (Dai and Mumper 2010; Torre 2017; Zolotareva et al. 2019). En effet, cette maladie osseuse découle d'un stress oxydant qui impacte le remodelage osseux en stimulant la différenciation des pré-ostéoclastes et l'activité des métalloprotéinases extracellulaires, tout en déclenchant l'apoptose des ostéoblastes et des ostéocytes (Banfi et al. 2008; Wauquier et al. 2009; Lepetsos and Papavassiliou 2016; Savasky et al. 2018; Zeng et al. 2020). En plus de ce pouvoir antioxydant, il a été démontré dans plusieurs études que les composés phénoliques possédaient des propriétés ostéogéniques et minéralogéniques stimulant ainsi l'ostéogenèse et la densification des os par leur minéralisation (Habauzit and Horcajada 2008; Córdoba et al. 2015; Surget et al. 2017; Carson et al. 2018; Roberto et al. 2021). Cette stimulation osseuse serait le résultat, d'une part, de l'augmentation de l'activité de l'ALP qui intervient dans la minéralisation en inhibant le pyrophosphate extracellulaire, un inhibiteur de la minéralisation, et d'autre part, de l'augmentation de l'expression de collagène de type I, de sialoprotéine osseuse et d'ostéopontine (Koshi et al. 2019; Vimalraj 2020). Un phlorotannin extrait d'*Ecklonia cava* (Phaeophyceae), le phlorofucofuroeckol A, a permis d'améliorer l'ostéoblastogenèse de cellules souches mésenchymateuses humaines dérivées de la moelle osseuse par stimulation de l'expression de protéines critiques telles que l'ALP, la protéine morphogénétique osseuse (BMP-2), l'ostéocalcine et la  $\beta$ -caténine (Oh et al. 2019). De même, l'hyperoside, un flavonoïde, a démontré des propriétés d'intérêt pour traiter les cancers osseux en inhibant la prolifération et en stimulant la différenciation ostéogénique des cellules d'ostéosarcomes humains (Zhang et al. 2014). En association avec ces propriétés bénéfiques pour les os, les composés

phénoliques possèdent des activités antibactériennes par l'inhibition de la phosphorylation oxydative ainsi que par leur capacité à se lier aux protéines membranaires bactériennes, impactant ainsi leurs structures et leurs fonctions, et entraînant la lyse cellulaire (Shannon and Abu-Ghannam 2016). Ainsi, ces composés pourraient être une solution pour lutter contre les bactéries antibiorésistantes, telles que *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline (SARM) causant des infections nosocomiales sévères, ou *Pseudomonas aeruginosa* résistant à la fluoroquinolone à l'origine de pneumonies, d'infections des systèmes circulatoire et urinaire, ou post-opératoires (Gasink et al. 2006; Eom et al. 2012; Shannon and Abu-Ghannam 2016). Etant donné l'intérêt croissant pour l'utilisation de substances naturelles dans le secteur médical, l'objectif serait d'associer les composés phénoliques à des biomatériaux implantés dans les lacunes osseuses pour stimuler la régénération osseuse tout en empêchant la prolifération bactérienne *in situ* (Im et al. 2017; Mieszkowska et al. 2020; Platania et al. 2021).

#### 5.2.6. Extraction et purification des composés phénoliques

Plusieurs méthodologies sont utilisées pour extraire, purifier et caractériser les composés phénoliques (Zubia et al. 2009; Dai and Mumper 2010; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Le Lann et al. 2016; Abu Khalaf et al. 2019; Santos et al. 2019; Cotas et al. 2020; Gager et al. 2021). Les procédures se déroulent en plusieurs étapes successives : le prétraitement, l'extraction et la purification parfois couplée avec la quantification et la caractérisation structurale des molécules.

Le **prétraitement** est nécessaire pour éliminer les résidus de cailloux, de terre, de sable ou de sels, ainsi que les épibiontes présents en surface des spécimens. Par la suite, la biomasse peut être utilisée soit fraîche, soit séchée (à l'air libre ou au lyophilisateur), afin de préserver toute la qualité des métabolites végétaux. La biomasse est généralement broyée afin d'améliorer le rendement de l'extraction car la surface de contact et l'accès aux composés sont augmentés. Une étape de pré-extraction est parfois ajoutée afin de retirer certains composés tels que les pigments et les composés lipidiques par ajout de solvants apolaires (e.g. hexane ou dichlorométhane) (Santos et al. 2019; Cotas et al. 2020).

L'**extraction** se fait classiquement par une macération solide/liquide avec différents cycles d'extraction ou avec un cycle continu d'extraction comme, à titre d'exemple, avec l'appareil de Soxhlet. La macération consiste à immerger la matière première végétale dans un grand volume de solvant. Les solvants utilisés sont purs ou sont des mélanges hydroalcooliques avec de l'éthanol ou du méthanol. Le mélange est ensuite chauffé durant plusieurs heures sous agitation dans des conditions de faible luminosité (Breton et al. 2011; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Gager et al. 2020). L'utilisation de l'appareil

de Soxhlet permet une extraction continue des composés. La matière première est mise en contact avec un solvant, puis une filtration permet de récupérer l'extrait. Ce dernier est chauffé afin d'évaporer le solvant qui sera condensé plus haut dans l'appareil pour retomber sur la matière première et recommencer le cycle d'extraction. Ce procédé permet d'obtenir un haut rendement d'extraction (épuisement en continu de la poudre végétale), tout en utilisant un volume de solvant réduit. Cependant, le chauffage continu de l'extrait à la température d'évaporation du solvant peut entraîner la dégradation de composés thermolabiles (Cotas et al. 2020). Les protocoles de ces méthodes peuvent être adaptés selon les solvants, les temps et la température d'exécution. Ces deux méthodes sont relativement efficaces, prennent du temps et nécessitent souvent l'utilisation de solvants toxiques comme le méthanol, l'hexane, l'éther de pétrole ou encore l'acétone, qui sont coûteux et surtout toxiques pour le manipulateur et l'environnement (Audibert et al. 2010; Tanniou et al. 2013; Stiger-Pouvreau et al. 2014). Des techniques d'extraction plus écologiques ont été mises au point afin de pallier ces limites, par exemple, les extractions assistées par des ultrasons (Rodrigues et al. 2015; Moreira et al. 2017; Agregán et al. 2018), par des micro-ondes (Yuan et al. 2018; Zhang et al. 2018) ou par des enzymes (Rodrigues et al. 2015), qui utilisent respectivement la cavitation acoustique, les radiations et des enzymes pour détériorer les parois cellulaires des végétaux, ce qui augmente les surfaces de contact avec le solvant, la vitesse d'exécution et les rendements. L'extraction par fluide supercritique (SFE) (Tanniou et al. 2013) et l'extraction accélérée par solvant (ASE ou PLE pour pressurized-liquid extraction) (Zubia et al. 2009; Tierney et al. 2013) sont également des procédés applicables à l'extraction des composés phénoliques dans une optique de techniques plus écoresponsables (Tanniou et al. 2013). La SFE utilise généralement le CO<sub>2</sub> supercritique pour extraire les composés. Le fluide est soumis à une température et une pression critiques afin qu'il se retrouve entre la transition d'état. Ce fluide est peu visqueux comparé aux solvants organiques ce qui permet une meilleure pénétration dans la matière et augmente les rendements. Le procédé est réalisé à basse température pour réduire l'impact sur les composés, cependant, il ne permet pas d'extraire les composés apolaires (Cotas et al. 2020). L'ASE est une technique partiellement automatisée basée sur le principe de l'extraction solide-liquide ayant la particularité d'être réalisée sous haute pression et température élevée. Le rendement et le temps d'extraction sont ainsi améliorés et les volumes de solvants utilisés sont réduits en comparaison à la macération classique. De plus, elle peut être transposée à l'échelle industrielle mais la haute température peut aussi entraîner la polymérisation ou l'oxydation des composés (Tanniou et al. 2013; Cotas et al. 2020). De plus, l'éthanol peut être choisi comme solvant ce qui réduit l'impact écologique tout en restant efficace grâce aux conditions d'extraction (Zubia et al. 2009; Tanniou et al. 2013; Prat et al. 2016). Cependant, ces techniques ne permettent pas une sélectivité des composés phénoliques et des étapes de purification sont nécessaires après la réduction du volume de l'extrait brut par évaporation.

La **purification** des composés phénoliques peut également être réalisée selon différents procédés. A la suite des extractions solide/liquide et l'obtention d'un extrait brut, une purification liquide/liquide est souvent utilisée et consiste en une succession de lavages avec différents solvants dont la polarité varie, ce qui permet une séparation des composés phénoliques d'autres molécules telles que les lipides, les glucides, les protéines et les pigments (Audibert et al. 2010; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Ar Gall et al. 2015). Cette technique a démontré son efficacité notamment pour les composés des algues brunes et vertes (Le Lann et al. 2016; Surget et al. 2017), ainsi que pour les algues rouges (Projet INTERREG IVB MARMED) et les plantes halophiles (Surget et al. 2015). Cependant, au même titre que la macération, cette technique nécessite de nombreux solvants comme le dichlorométhane, l'acétone ou l'acétate d'éthyle en grande quantité, limitant ainsi la mise à l'échelle industrielle. Des méthodes alternatives existent comme la dialyse (Breton et al. 2011), l'extraction en phase solide (SPE) (Zubia et al. 2009), la chromatographie de partage centrifuge (CPC) (Tanniou et al. 2013), la chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC pour thin-layer chromatography) ou la chromatographie liquide sur colonne (HPLC ou Flash chromatographie) (Cotas et al. 2020; Gager et al. 2021).

Suite à ces différentes purifications, la **quantification** et la **caractérisation** des composés phénoliques sont réalisées par plusieurs méthodes. La quantification est majoritairement faite par le test colorimétrique de Folin-Ciocalteu, qui est une réaction redox avec les composés phénoliques, cependant, la réaction n'est pas exclusive à ces composés et des interférences peuvent apparaître. Ce test reste largement utilisé pour sa facilité d'utilisation, sa rapidité et son faible coût car il donne une première estimation des teneurs en composés phénoliques (Stiger-Pouvreau et al. 2014; Cotas et al. 2020). La caractérisation structurale des composés phénoliques n'est pas une chose aisée, ainsi, il est souvent nécessaire de combiner plusieurs analyses telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS) qui sont les techniques analytiques les plus couramment utilisées (Cérantola et al. 2006; Surget et al. 2015; Vissers et al. 2017; Abu Khalaf et al. 2019).

### 5.2.7. Procédés utilisés et espèces choisies pour ces travaux

Dans ces travaux de thèse nous avons décidé d'extraire les composés phénoliques en utilisant des techniques d'extraction par macération à l'éthanol 50% ou 30% pour réduire l'impact environnemental. Par la suite, deux stratégies de purification ont été testées :

- 1 - Une purification conventionnelle liquide/liquide suivie d'une SPE (détaillée dans le **chapitre III** de ce manuscrit).
- 2 - Une purification innovante et plus écoresponsable avec la résine Diaion HP-20 en association à de l'éthanol (détaillée dans le **chapitre IV** de ce manuscrit).

L'objectif final était d'obtenir et de caractériser des composés phénoliques bioactifs aux potentiels ostéogéniques et antibactériens, à partir de différentes espèces de végétaux marins des côtes bretonnes.

La résine Diaion HP-20 (CAS 9052-95-3) est un copolymère styrène-divinylbenzène non polaire utilisé en chromatographie en phase inverse. Elle est macroporeuse, réutilisable et se présente sous forme de particules sphériques blanches de 0,5 mm de diamètre. Des études se sont intéressées à son utilisation pour la purification des composés phénoliques de plantes terrestres comme *Rhodiola crenulata* (Sun et al. 2018), *Prunus mume* (Mitani et al. 2018) et *Plantago major* (Hanh et al. 2020), ainsi que de macroalgues brunes comme *Ecklonia cava* (Kim et al. 2014), *Macrocystis pyrifera* (Leyton et al. 2017) et *Eisenia bicyclis* (Koshi et al. 2019). L'utilisation de cette résine permettrait de se rapprocher de certains des principes de la chimie verte proposés par Anastas and Eghbali (2010) tels que :

- **Une prévention** de la formation de déchets pour éviter d'avoir à les traiter ou les nettoyer.
- **Des solvants et auxiliaires plus sûrs.**
- **Une prévention des accidents** notamment en limitant l'utilisation de solvants toxiques.

De plus, le choix des végétaux des côtes bretonnes permet d'avoir une **matière première renouvelable** comme indiqué dans l'approche en chimie verte.

Six espèces de végétaux marins ont été sélectionnées et étudiées dans ce travail de thèse. Leur sélection a été réalisée selon différents critères tels que leur disponibilité sur les côtes bretonnes, leur abondance et les activités recensées dans la littérature. La collecte des spécimens a été réalisée en minimisant les impacts environnementaux.

- ***Beta vulgaris subsp. maritima*** (L.) Arcang., 1882 (**Figure I.15**)

Embranchement :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Caryophyllales
Famille :	Amaranthaceae
Genre :	<i>Beta</i>
Espèce :	<i>Beta vulgaris</i>
Sous-espèce :	<i>Beta vulgaris subsp. maritima</i>
Nom vernaculaire :	Betterave maritime



© V. Lamare - Doris.ffessm.fr

**Figure I.15.** Photo de *Beta vulgaris subsp. maritima*.

Description : *Beta vulgaris subsp. maritima*, aussi connue sous le nom de *Beta maritima*, est une plante halophile vivace ou bisannuelle dont la taille varie entre 30 et 80 cm. Sa tige faible souvent couchée est glabre ou légèrement poilue, elle est verte et parfois teintée de rouge. Ses longues feuilles charnues ondulées à nervures épaisses sont ovales ou rhomboïdales et fortement rétrécies au pétiole. Sa racine est dure et peu épaisse. Sa floraison se déroule de juin à septembre avec de petites fleurs vertes ou rosâtres regroupées en glomérules le long d'épis.

Localisation : Son aire de distribution s'étend des bords de la partie occidentale de la mer Baltique à la mer Méditerranée en longeant les côtes européennes de l'océan Atlantique. Elle privilégie les sols salins et les rochers maritimes (Biancardi et al. 2012).

Composés phénoliques bioactifs : *B. maritima* était utilisée traditionnellement comme plante médicinale pour traiter les troubles digestifs, l'anémie, les brûlures et douleurs de la gorge grâce à ses composés phénoliques antioxydants. Bien que son utilisation ait diminué avec le temps, elle est encore utilisée dans les remèdes homéopathiques et naturels, en particulier pour le bien-être du tube digestif (Biancardi et al. 2012; Morales et al. 2014).

- ***Bifurcaria bifurcata*** R. Ross, 1958 (**Figure I.16**)

Embranchement :	Ochrophyta
Classe :	Phaeophyceae
Ordre :	Fucales
Famille :	Sargassaceae
Genre :	<i>Bifurcaria</i>
Espèce :	<i>Bifurcaria bifurcata</i>
Nom vernaculaire :	Bifurcaire



**Figure I.16.** Photo de *Bifurcaria bifurcata*.

Description : *Bifurcaria bifurcata* est une macroalgue brune pérenne pouvant mesurer jusqu'à 50 cm. Elle est formée de cordons cylindriques lisses bruns jaunâtre de 3-5 mm de diamètre dont la base est unique, puis il y a des ramifications dichotomiques jusqu'aux extrémités arrondies du thalle. Des aérocytes (ou flotteurs ou vésicules aérifères) sont visibles sur certains thalles. Sa base est sous la forme d'un faux rhizome rampant. La reproduction se fait au printemps par l'intermédiaire de conceptacles hermaphrodites aux extrémités des rameaux.

Localisation : *B. bifurcata* est retrouvée depuis la Manche jusqu'à l'océan Atlantique sur les côtes de la Grande-Bretagne, la France et l'Espagne. Elle se situe en haut de l'étage infralittoral en mode battu, semi-battu ou abrité. Elle reste généralement immergée et peut se retrouver dans des cuvettes rocheuses (Stiger-Pouvreau et al. 2014).

Composés phénoliques bioactifs : *B. bifurcata* appartient à l'ordre des Fucales qui est un ordre connu pour regrouper des espèces aux teneurs élevées en composés phénoliques comme les fuhalols (cf. **Figure I.12** pour l'illustration de ces composés). Plusieurs études ont démontré la diversité d'activités associées à des extraits et fractions enrichies en composés phénoliques chez cette espèce telles que des propriétés antioxydantes, antifouling, anti-tumorales et antibactériennes (Maréchal et al. 2004; Zubia et al. 2009; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Alves et al. 2016; Agregán et al. 2018).



- ***Cladophora rupestris* (L.) Kütz., 1843 (Figure I.17)**

Embranchement :	Chlorophyta
Classe :	Ulvophyceae
Ordre :	Cladophorales
Famille :	Cladophoraceae
Genre :	<i>Cladophora</i>
Espèce :	<i>Cladophora rupestris</i>
Nom vernaculaire :	Cladophore des rochers



Figure I.17. Photo de *Cladophora rupestris*.

**Description :** *Cladophora rupestris* est une macroalgue verte pouvant atteindre 10-20 cm. Son thalle touffu vert foncé est composé de filaments unisériés ramifiés de 100-200 µm de diamètre. Sa base est sous forme de rhizoïdes enchevêtrés.

**Localisation :** Son aire de répartition s'étend de la Scandinavie jusqu'au nord du Sénégal ainsi qu'en mer Méditerranée et mer Noire mais également sur les côtes de l'Atlantique Nord-Ouest. Elle est subarctique à tempérée et ne supporte pas des températures supérieures à 25-30°C. Elle se développe sur les zones rocheuses en bas de l'estran dans des cuvettes jusqu'à 20-30 m de profondeur ou plus haut sur l'estran protégée par des *Fucus* et des *Ascophyllum* (Munir et al. 2019).

**Composés phénoliques bioactifs :** Des études portant sur des fractions enrichies en composés phénoliques de *C. rupestris* ont démontré la présence d'activités antibactériennes, antioxydantes, antidiabétiques et antiparasitaires, ainsi que des propriétés ostéogéniques et minéralogiques (Surget et al. 2017; Munir et al. 2019).

- ***Codium fragile*** (Suringar) Hariot, 1889 (**Figure I.18**)

Embranchement :	Chlorophyta
Classe :	Ulvophyceae
Ordre :	Bryopsidales
Famille :	Codiaceae
Genre :	<i>Codium</i>
Espèce :	<i>Codium fragile</i>
Nom vernaculaire :	Algue chou-fleur



**Figure I.18.** Photo de *Codium fragile*.

Description : *Codium fragile* est une macroalgue verte pouvant atteindre 30 cm de long pour 40 cm de large. Son thalle spongieux est à ramification cylindrique présente une dichotomie régulière et se termine par des mucrons apicaux.

Localisation : *C. fragile* est une macroalgue cosmopolite et elle est considérée comme hautement invasive. Originaires du Pacifique, elle a été introduite en mer Méditerranée dans les années 1940 puis elle s'est répandue sur les côtes de l'Atlantique Nord-Est jusqu'à la Scandinavie. Elle est recensée présente sur les côtes de tous les continents. Elle se trouve sur l'étage infralittoral supérieur jusqu'à 10 m de profondeur (McDonald et al. 2015).

Composés phénoliques bioactifs : Cette espèce présente un intérêt particulier car une étude a mis en avant des propriétés ostéostimulantes d'une fraction enrichie en composés phénoliques (Surget et al. 2017).

- ***Crithmum maritimum*** Linnaeus, 1753 (Figure I.19)

Embranchement :	Tracheophyta
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Apiales
Famille :	Apiaceae
Genre :	<i>Crithmum</i>
Espèce :	<i>Crithmum maritimum</i>
Nom vernaculaire :	Criste marine

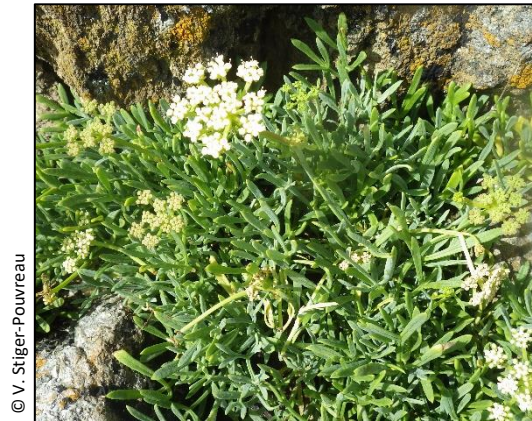


Figure I.19. Photo de *Crithmum maritimum*.

**Description :** *Crithmum maritimum* est une plante vivace et halophile dont la surface est glabre. Sa tige d'un vert foncé est une lanière centrale présentant une gouttière médiane. Elle peut atteindre 15-50 cm de long. Ses feuilles sont charnues et divisées en lanières qui se finissent par des lobes lancéolés pointus. Ses fleurs sont d'un blanc verdâtre et sont disposées en ombelles qui donneront un fruit spongieux. Sa floraison se déroule de juillet à octobre.

**Localisation :** *C. maritimum* est localisée sur les côtes de l'Atlantique Nord-Est, de la Méditerranée et de la mer Noire. Elle est retrouvée dans les milieux exposés aux embruns comme les falaises, les littoraux rocheux ... aussi bien sur des substrats calcaires que siliceux (Meot-Duros and Magné 2009; Pereira et al. 2017).

**Composés phénoliques bioactifs :** Des études menées sur des fractions enrichies en composés phénoliques de cette espèce ont mis en évidence la présence d'activités antioxydante et antimicrobienne inhibant la croissance de bactéries à Gram-positif (*Micrococcus luteus*, *Erwinia carotovora* et *Bacillus cereus*), à Gram-négatif (*Salmonella arizonae*, *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* et *Escherichia coli*) et d'une levure (*Candida albicans*) (Meot-Duros et al. 2008; Meot-Duros and Magné 2009; Pereira et al. 2017).

- ***Plantago lanceolata*** Linnaeus, 1753 (Figure I.20)

Embranchement :	Tracheophyta
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Lamiales
Famille :	Plantaginaceae
Genre :	<i>Plantago</i>
Espèce :	<i>Plantago lanceolata</i>
Nom vernaculaire :	Plantain lancéolé



Figure I.20. Photos de *Plantago lanceolata*.

Description : *Plantago lanceolata* est une plante vivace pouvant mesurer entre 10 et 100 cm. Sa base forme une touffe compacte où les feuilles sont disposées en rosette basale. Les feuilles sont lancéolées et peuvent être linéaires ou ovales. De fins poils sont présents sur les feuilles qui sont caractérisées par la présence de 3 à 7 nervures longitudinales marquées. Sa racine est pivotante avec des rhizomes rampants peu profonds. Les hampes florales sans feuilles sont sillonnées de cinq coutures et portent en leurs extrémités un épi de forme ovoïde à cylindrique de 1-7 cm de long.

Localisation : *P. lanceolata* est présent dans de nombreux habitats à l'exception des sols acides, ainsi, son aire de répartition est circumpolaire tempérée méridionale. Il se trouve dans les prairies, les hautes terres, les saillies, les crevasses, sur les bords de route et des rivières, les pelouses, les dunes ou encore les falaises y compris en présence d'embruns (Gonçalves and Romano 2016).

Composés phénoliques bioactifs : Les plantains sont traditionnellement utilisés pour leurs vertus médicinales en raison de leurs propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires et cicatrisantes (Gonçalves and Romano 2016). En effet, les extraits bruts de *Plantago* sp. riches en flavonoïdes possèdent des propriétés antioxydantes (Beara et al. 2009). De même, des extraits riches en flavonoïdes tels que l'apigénine, la lutéoline, la baicaléine ou la népétine présentent des capacités sédatives, analgésiques et antibactériennes inhibant la croissance de *S. aureus* et d'autres bactéries à Gram-positif ou à Gram-négatif multi-résistantes aux antibiotiques (Radu et al. 2010; Alemu and Andualem 2014).

Ce second axe de recherche est développé dans les **chapitres III et IV** de la thèse sous la forme d'articles scientifiques et de compléments pour répondre aux questions suivantes :

- Les végétaux sélectionnés peuvent-ils fournir des composés phénoliques présentant des activités ostéogéniques et/ou antibactériennes ?
- Les deux stratégies de purification permettent-elles d'obtenir des résultats comparables ?
- Le procédé plus écoresponsable peut-il concurrencer ou remplacer le procédé conventionnel ?
- La purification des composés phénoliques est-elle suffisante ?
- La caractérisation des composés phénoliques est-elle possible ?





---

# CHAPITRE II

DEVELOPPEMENT D'UN BIOMATERIAU

RETICULE A BASE DE COLLAGENE DE

SAUMON

---



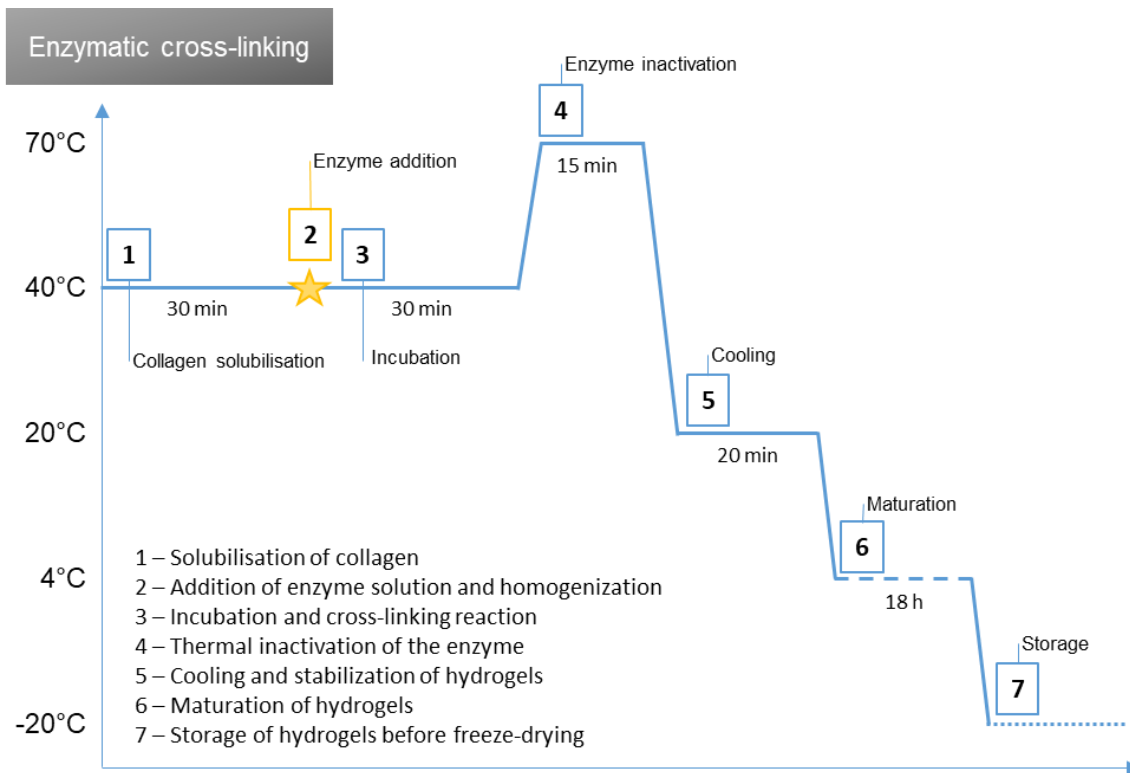
## 1. PREAMBULE

Le collagène est une protéine utilisée en ingénierie tissulaire osseuse afin de former des matériaux biomimétiques de la trame organique des os (Khurana et al. 2010; Xia et al. 2013; Wang et al. 2019; Ngadimin et al. 2021). Cette protéine présente une facilité d'extraction, ainsi qu'une capacité thermoréversible à changer d'état entre une solution liquide et un gel cohésif, par transition de conformation moléculaire entre une structure de pelote et d'hélice (Harrington and Rao 1970; Djabourov 1988; Djabourov et al. 1988a, b; Jeong et al. 2012; Bello et al. 2020). Face à certaines réticences quant aux possibles risques sanitaires et aux contraintes socio-culturelles (*développés dans le Chapitre I*), de nouvelles sources de collagènes ont été recherchées comme les collagènes marins. Ces collagènes sont biocompatibles et de poids moléculaires généralement inférieurs à ceux des collagènes terrestres, entraînant une meilleure absorption avec des risques réduits de réactions inflammatoires et immunitaires (Chen et al. 2014; Silvipriya et al. 2015; Bhagwat and Dandge 2018; Huang et al. 2019; Lim et al. 2019; Subhan et al. 2020). Le choix de cette étude s'est porté sur le collagène de la peau du saumon atlantique (*Salmo salar*), dans l'optique d'obtenir un collagène marin et, d'initier une valorisation de coproduits riches en collagène de l'industrie alimentaire, offrant pérennité et traçabilité de la ressource utilisée. Ce collagène, similaire aux collagènes de mammifères, présente cependant de légères différences de teneurs en acides aminés, diminuant ainsi sa résistance face aux contraintes mécaniques et thermiques (Jongjareonrak et al. 2006; Ferraro et al. 2010; Mohtar et al. 2013). Pour améliorer les propriétés du collagène de saumon, il est possible de le soumettre à une réaction de réticulation, *i.e.* la création de liaisons covalentes au sein du réseau protéique (Zhao et al. 2016). Pour cela, il est commun d'utiliser des agents chimiques tels que le glutaraldéhyde (GTA) qui, bien que très efficace, présente des risques de cytotoxicité (Charulatha and Rajaram 2003; Drury and Mooney 2003; Elango et al. 2017; Sundar et al. 2020). Ainsi, dans ce travail de thèse et plus largement dans le projet BLUEHUMAN, la réticulation enzymatique par transglutaminase microbienne (MTG) a été choisie comme alternative (Bello et al. 2020; Rico-Llanos et al. 2021).

Ce chapitre reprend le développement du biomatériau à base de collagène marin par la réaction de réticulation enzymatique. Le matériel collagénique brut a été caractérisé en amont par des analyses proximales des teneurs d'humidité, de matière grasse, de protéines, de cendres, ainsi qu'une analyse de la composition en acides aminés par la société Upsciences (Vannes, France). La distribution du poids moléculaire a été examinée en conditions dénaturantes par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE), et en conditions non-dénaturantes par chromatographie d'exclusion stérique (SEC-HPLC) au laboratoire. Le protocole de réticulation enzymatique a été optimisé (**Figure II.1**), en utilisant trois concentrations d'enzyme, par

l'analyse des propriétés rhéologiques, structurales et par l'étude de la stabilité des matrices. Les analyses rhéologiques ont été mises en place et réalisées en collaboration avec le Pr. Thierry Aubry et Philippe Roquefort de l'IRD (UMR CNRS 6027) au sein de l'UBO. La microstructure des matrices a été analysée par microscopie électronique à balayage (MEB) à la plateforme d'imagerie et de mesures en microscopie (PIMM) de l'UBO. La structure chimique a été caractérisée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et la formation de liaisons covalentes a été mesurée par le degré de réticulation (méthode OPA) au laboratoire. Enfin, la stabilité à moyen-terme des hydrogels et des éponges a été observée au laboratoire. Dans ce travail, le potentiel du collagène marin a été étudié en comparaison au collagène de porc, par réticulation enzymatique *versus* réticulation chimique.

**L'objectif principal de ce chapitre est ainsi de générer des matrices de collagène marin par l'intermédiaire d'une réticulation enzymatique, dont les propriétés, telles que décrites ci-dessus, sont caractérisées afin d'obtenir un biomatériau prometteur pour l'ingénierie tissulaire osseuse.**



**Figure II.1.** Visualisation des différentes étapes du protocole optimisé de réticulation enzymatique par la tansglutaminase microbienne du collagène de type I de peau de saumon atlantique.

Dans l'article scientifique qui suit, nous avons décidé d'employer le terme gélatine pour identifier les molécules de collagène. En effet, le collagène que nous avons utilisé a été obtenu par un procédé non conventionnel sans utilisation d'acide ou d'enzyme, en suivant le brevet WO 2016/142633 (Hemon et al. 2016), qui a été développé pour extraire le collagène de peaux de poissons par le partenaire YSLAB et le LEMAR au cours des travaux de thèse de Provost (2016).

## 2. MANUSCRIT DU PREMIER ARTICLE SCIENTIFIQUE

### **Mechanically enhanced *Salmo salar* gelatin by enzymatic cross-linking: premise of a bioinspired material for food packaging, cosmetics and biomedical applications**

Manon Buscaglia<sup>1</sup>, Fabienne Guérard<sup>1</sup>, Philippe Roquefort<sup>2</sup>, Thierry Aubry<sup>2</sup>, Marilynne Fauchon<sup>1</sup>, Yannick Toueix<sup>1</sup>, Valérie Stiger-Pouvreau<sup>1</sup>, Claire Hellio<sup>1</sup> & Gwenaëlle Le Blay<sup>1</sup>

*(1) Université de Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, F-29280 Plouzané, France*

*(2) Université de Bretagne Occidentale, IRDL, UMR CNRS 6027, F-29200 Brest, France*

*Corresponding author at: Université de Brest, Institut Universitaire Européen de la Mer, IUEM/UBO, Laboratoire des sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539 LEMAR, Technopôle Brest Iroise, Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France.*

*E-mail: [gwenaelle.leblay@univ-brest.fr](mailto:gwenaelle.leblay@univ-brest.fr) (G. Le Blay)*

**Keywords:** Cross-linking / Marine biomaterial / Microbial transglutaminase / Rheology / Salmon gelatin

*Manuscrit soumis au journal Marine Biotechnology sous le numéro MBTE-D-22-00037.*

## 2.1. Résumé

Les coproduits d'animaux marins issus de l'industrie alimentaire constituent une source importante de biomolécules susceptibles d'être valorisées. Les peaux et les os sont riches en collagène, une protéine qui trouve des applications diverses sous sa forme native ou partiellement hydrolysée (gélatine), tant dans l'industrie alimentaire, que dans la cosmétique ou le secteur médical. La gélatine de saumon est un candidat d'intérêt en raison de sa production élevée en termes de biomasse, de sa disponibilité de par la consommation de saumon, de sa biodégradabilité et de sa biocompatibilité élevée. Cependant, ses faibles propriétés mécaniques et thermiques peuvent constituer un obstacle pour les applications nécessitant un matériau cohésif. Ainsi, la modification de la gélatine par réticulation est nécessaire. La réticulation enzymatique par transglutaminase microbienne (MTG) est préférée à la réticulation chimique pour éviter la formation de résidus potentiellement cytotoxiques. Dans ce travail, le potentiel de la gélatine de peau de saumon, réticulé par traitement enzymatique *versus* traitement chimique, a été étudié et comparé à celui de la gélatine de porc. Dans ce but, les deux méthodes de réticulation ont été utilisées pour générer des hydrogels et des éponges tridimensionnels, poreux et mécaniquement renforcés avec différents ratios de MTG (2%, 5% et 10% du poids de gélatine). Leurs propriétés biochimiques, rhéologiques et structurelles ont été caractérisées, ainsi que la stabilité du matériau, y compris le degré de synérèse et la capacité de liaison à l'eau. Les résultats ont montré que la gélatine réticulée par voie enzymatique conduit à l'obtention d'un matériau dont la densité de réticulation est élevée, et dont plus de 70% des groupes aminés initialement libres sont engagés après réticulation. L'ajout de MTG semble jouer un rôle crucial, comme le montre l'augmentation de la résistance mécanique et thermique associée à la production d'un matériau cohésif stable au-dessus de 40°C pendant au moins 7 jours, ce qui est comparable aux propriétés de la gélatine de porc et la gélatine réticulée par voie chimique. Deux prototypes ont été obtenus, ils présentent une résistance thermique similaire mais des microstructures et des propriétés viscoélastiques différentes, en raison de différentes dynamiques de formation du réseau covalent. Au vu de ces résultats, la gélatine de saumon réticulée par voie enzymatique est un candidat pertinent en tant que biopolymère pour la production de matrices destinées à une large gamme d'applications biotechnologiques telles que les emballages alimentaires, les patchs cosmétiques, les pansements cicatrisants ou les substituts tissulaires.

## 2.2. *Abstract*

Marine animal by-products of the food industry are a great source of valuable biomolecules. Skins and bones are rich in collagen, a protein with various applications in food, cosmetic, healthcare and medical industries in its native form or partially hydrolyzed (gelatin). Salmon gelatin is a candidate of interest due to its high biomass production available through salmon consumption, its biodegradability and its high biocompatibility. However, its low mechanical and thermal properties can be an obstacle for various applications requiring cohesive material. Thus, gelatin modification by cross-linking is necessary. Enzymatic cross-linking by microbial transglutaminase (MTG) is preferred to chemical cross-linking to avoid the formation of potentially cytotoxic residues. In this work, the potential of salmon skin gelatin was investigated, in a comparative study with porcine gelatin, and an enzymatic versus chemical cross-linking analysis. For this purpose, the two cross-linking methods were applied to produce three-dimensional, porous and mechanically reinforced hydrogels and sponges with different MTG ratios (2%, 5% and 10% w/w gelatin). Their biochemical, rheological and structural properties were characterized, as well as the stability of the material, including the degree of syneresis and the water binding capacity. The results showed that gelatin enzymatically cross-linked produced material with high cross-linking densities over 70% of free amines. The MTG addition seemed to play a crucial role, as shown by the increase in mechanical and thermal resistances with the production of a cohesive material stable above 40°C for at least 7 days and comparable to porcine and chemically cross-linked gelatins. Two prototypes were obtained with similar thermal resistances but different microstructures and viscoelastic properties, due to different formation dynamics of the covalent network. Considering these results, the enzymatically cross-linked salmon gelatin is a relevant candidate as a biopolymer for the production of matrix for a wide range of biotechnological applications such as food packaging, cosmetic patch, wound healing dressing or tissue substitute.

### 2.3. *Introduction*

Gelatin is a protein obtained from partial hydrolysis of collagen (Lv et al. 2019). Collagen is the most abundant protein in vertebrate organisms, as a primordial extracellular component representing up to 30% of their total proteins (Bae et al. 2008; Berendt et al. 2008; Gu et al. 2019). Its structure is a three-dimensional triple helix combining  $\alpha$ -chains connected by hydrogen bonds. The collagen molecules are linked together to form fibers providing flexibility, stability and resistance to tissues (Gelse et al. 2003; Bhagwat and Dandge 2018). The gelatin is formed by free  $\alpha$  chains that can arranged themselves in a triple helix, like collagen structure, if the gelling temperature is reached (coil  $\rightarrow$  helix transition) (Harrington and Rao 1970; Djabourov 1988; Bello et al. 2020). Gelatin, as collagen, is a biopolymer used in various industrial fields such as food, cosmetic, healthcare and medical industries (Gómez-Estaca et al. 2009; Huang et al. 2019; Lv et al. 2019). This protein has been attracting the attention of manufacturers and scientists for decades due to its wide range of applications as stabilizer, texturizer, cohesion agent, protein provider, film protector or moisture preserver (Ehrlich 2015; Lv et al. 2019). Gelatin has promising applications in food manufactures as packaging or edible coatings for meat products (Battisti et al. 2017; Díaz-Calderón et al. 2017; Prasad 2021), in healthcare as edible capsules releasing bioactive nutrients or in medicine with recent developments as polymer for wound healing dressing and tissue engineering with the 3D printing (Van Vlierberghe et al. 2011; Acevedo et al. 2019; Echave et al. 2019; Bello et al. 2020; Da Silva et al. 2021; Prasad 2021). This molecule enables the recovery of animal parts intended for animal meal production as it is extracted from by-products of the food industry, such as skin and bones. This recovery is environmentally beneficial with a zero waste approach but also economically by obtaining high value added products from discarded biomass (Silvipriya et al. 2015; Huang et al. 2019; Nitsuwat et al. 2021).

Gelatin-based biomaterials are widely used as basic matrices due to their biocompatibility, biodegradability, low antigenicity, cell growth potential and adaptable mechanical properties (Broderick et al. 2005; Van Vlierberghe et al. 2011; Echave et al. 2019; Lv et al. 2019). Generally, used gelatin have mammalian origin, mainly bovine and porcine (Ferraro et al. 2010; Nitsuwat et al. 2021). This origin raises health concerns with the possible transmission of infectious vectors such as prions and may not conform to certain cultural and religious restrictions for some Muslim and Jewish communities (representing almost 23% of world's population) (Charulatha and Rajaram 2003; Song et al. 2006; Bhat and Karim 2009; Huang et al. 2019). To overcome these constraints other gelatin sources with high biocompatibility and similar structural and mechanical properties have to be found.

Marine gelatin from fishing by-products could be an interesting alternative since it represents a huge source of collagen that can provide gelatin. Currently, about 50-75% of the total catch weight represents a waste of raw materials that contains about 30% of skin and bones very rich in collagen

(Jongjareonrak et al. 2005; Bode et al. 2011; Bhagwat and Dandge 2018). Marine gelatin is as biocompatible as mammalian gelatin but it is less stable due to a lower content of proline and hydroxyproline, which stabilize the gel structure by creating hydrogen bonds (Jongjareonrak et al. 2006; Gómez-Estaca et al. 2009; Ferraro et al. 2010; Da Silva et al. 2014). This difference results in lower gelling and melting temperatures, but also in poorer physical and rheological properties for marine gelatin biomaterial (Gomez-Guillén et al. 2001; Haug and Draget 2011; Huang et al. 2019). This latter cannot therefore be used in applications requiring a thermal stability and high bloom degree (Bhat and Karim 2009; Ferraro et al. 2010). However, cross-linking reactions can improve these properties by amplifying the formation of new covalent bonds within the material (Bigi et al. 2001; Song et al. 2006). Stronger network removes the thermoreversible ability of gelatin to change state (Gomez-Guillén et al. 2001). Most commonly, chemical cross-linking agents are used, such as glutaraldehyde (GTA) or carbodiimides, as they are very effective. However, they present risks of cytotoxicity, and produce inflammatory reactions or tissue calcification (Chau et al. 2005; Chen et al. 2005; Barnes et al. 2007; Annamalai et al. 2019), which should be avoided in food, cosmetic or healthcare applications. An alternative method such as enzymatic cross-linking with microbial transglutaminase (MTG, EC.2.3.2.13) is then necessary. This food grade enzyme has a good cytocompatibility and it is recognized as safe for human ingestion (Huang et al. 2019; Adamiak and Sionkowska 2020). MTG catalyzes acyl transfer reactions between  $\gamma$ -carboxamide groups of peptide-bound glutamine residues (acyl donor) and  $\epsilon$ -amino groups of mainly lysine residues (acyl acceptor) that creates intermolecular or intramolecular  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine bonds (Folk 1970). Mechanical and proteolytic resistances are then increased without creating cytotoxic residues (Stachel et al. 2010; Zhao et al. 2016; Liu et al. 2020).

In this study, the gelatin was obtained from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skins. This species was chosen because its annual world production is 2.4 million tons (4.5% of the aquaculture fish production) for the food industry, which allows for sustainability, consistency of quality and traceability of the resource (FAO 2020). The properties of the gelatin were improved with MTG to obtain a biomaterial harboring mechanical and thermal properties adaptable to the different applications. To understand this subject, a deeper knowledge of the protein enzymatic cross-linking phenomena is required by the study of gelling properties. Thus, the objective of this study is to determine the optimal amount of enzyme needed to obtain a biomaterial capable of competing with chemical cross-linking and mammalian gelatin. The developed biomaterial was analyzed as hydrogel (highly hydrated matrix) and sponge (freeze-dried matrix). The efficiency of the cross-linking by MTG was performed with structural, biochemical and mechanical analyses. Attained results could find a practical application in controlling the structure of salmon gelatin with well-defined physical properties adaptable for various

applications such as food packaging, cosmetic patch, wound healing dressing or tissue substitute (Morimura et al. 2002; Bhagwat and Dandge 2018; Prasad 2021).

## 2.4. *Materials and methods*

### 2.4.1. *Material origins*

#### Biological materials

Gelatin from salmon was extracted by YSLAB company (Quimper, France) from skins obtained from MerAlliance company (Quimper, France) according to the patent WO 2016/142633 (Hemon et al. 2016). Salmon skins were cleaned, coarsely ground to increase the extraction yield and washed twice with 0.45M NaCl and clear water. Subsequently, thermal hydrolysis was performed followed by successive filtrations down to 0.4 mm and the supernatant containing gelatin was frozen at -20°C and freeze-dried. The resulting dry material was solubilized at 6% (w/v) in distilled water at 40°C and clarified by a 10-min centrifugation at 8000 g at 20°C to remove hydrophobic components (centrifuge 5810 R, Eppendorf, France). The supernatant was collected and freeze-dried for use in the following tests. Type A gelatin from porcine skin (300 bloom, BioReagent, Sigma-Aldrich, USA) extracted by acid procedure was used for comparison in cross-linking impacts. MTG was donated by BDF ingredients (Girona, Spain) in a powder form. The enzyme was obtained from the bacteria *Streptomyces mobaraensis* and the nominal activity was 125 U.g<sup>-1</sup> of powder.

#### Chemical materials

All chemicals and reagents used in this study were analytical grade. Buffer reagents, as sodium dihydrogen phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O), di-sodium hydrogen phosphate dodecahydrate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O) and sodium chloride (NaCl), were purchased from Carlo Erba Reagents (France). SDS-PAGE assay reagents and materials were received from Bio-Rad Laboratories (USA). Protein molecular weight markers for size-exclusion chromatography (SEC-HPLC), sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium azide, albumin from bovine serum (BSA), 2-mercaptoethanol (BME), L-Leucine and o-phthalaldehyde (OPA) were obtained from Sigma-Aldrich (USA). GTA (25% aq. solution) was purchased from Alfa Aesar (Germany).

### 2.4.2. *Material characterization*

The proximal analysis of the salmon gelatin were performed by UpScience (Vannes, France). Moisture content was determined gravimetrically by oven drying at 103°C for 4 h (*Internal method EAU-H 14*). Fat content was obtained by gravimetric method after a hot treatment with hydrochloric



acid followed by filtration, extraction with petroleum ether, solvent removal by distillation and residue drying (*Internal method MGRA-H 15 – process B*). Protein content was assessed by Dumas methodology (conversion factor of 6.25) (*Internal method DUMAS-H 14*). Total ash content was determined gravimetrically by a furnace (*Internal method CEND-H 13*).

Salmon and porcine gelatins were characterized by SDS-PAGE according to the method of Laemmli (1970) and the supplier instructions. Briefly, freeze-dried samples were dissolved in distilled water to 1 g.L<sup>-1</sup> and kept in a water bath at 40°C for 30 min. Solubilized samples were mixed at 1:1 (v/v) ratio with the Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 25% (v/v) glycerol, 0.01% bromophenol blue and 5% (v/v) BME freshly added). The mixtures were denatured in boiled water at 95°C for 5 min. Samples (20 µL) and protein markers (10 µL of Precision Plus Protein Standards Dual Colors) were loaded onto 4-20% polyacrylamide gel (Mini-Protean TGX) and submitted to electrophoresis at 150V using Mini-Protean Tetra System. After electrophoresis, gel was rinsed with distilled water and fixed with a solution of 50% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid for 30 min. Then, gel was stained with Bio-Safe Coomassie G-250 Stain overnight and destained with a solution of 10% (v/v) acetic acid for 30 min four times. The profiles of salmon and porcine gelatins were compared using a Gel Doc EZ Imager and the software Image lab 5.0.

Molecular weight distribution and proportion of salmon and porcine gelatins were estimated by SEC-HPLC according to GE Healthcare instructions on a device Dionex Ultimate 300 UHPLC<sup>+</sup> focused (ThermoFisher Scientific, France). Samples were suspended at 20 g.L<sup>-1</sup> in the mobile phase (0.05 M phosphate buffer containing 0.15 M NaCl and 0.02% (w/v) sodium azide, pH 7.2) and heated at 40°C for 30 min before filtration on 0.22 µm Millex PTFE filters (Merck Millipore, Ireland). Samples (10 µL) were loaded on a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare, Sweden) previously equilibrated with the mobile phase. The flow rate was 0.5 mL.min<sup>-1</sup> and all the system was heated at 35°C. Compounds leaving the column were detected at 220 and 280 nm and data were analyzed with Chromeleon 7 (ThermoFisher Scientific, France). The column was calibrated with standard compounds: thyroglobulin (669 kDa), apoferritin (443 kDa), β-amylase (200 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), albumin (66 kDa) and carbonic anhydrase (29 kDa) from Gel filtration markers kit 29-700 kDa (Sigma-Aldrich, USA) and cytochrome c (12.3 kDa) (Sigma-Aldrich, USA). The relation between retention time (RT) and molecular weight (MW) was:  $\log(\text{MW}) = -0.113 \times \text{RT} + 5.0793$ .

The amino acid compositions of salmon and porcine gelatins were determined by UpScience (Vannes, France) according to an internal method adapted from the EC regulation 152/2009 of January 27, 2009 (Commission 2009). Briefly, samples were hydrolyzed in hydrochloric acid and/or oxidized

with performic acid. They were separated on ion exchange chromatography and then characterized by reaction with ninhydrin using photometric detection at 440 and 570 nm. Amino acid contents of samples were reported as g/100g of protein.

### 2.4.3. Cross-linking procedures

Freeze-dried salmon and porcine gelatins were hydrated in phosphate buffer 0.1 M (pH 6) containing 0.02% (w/v) sodium azide at 40°C for 30 min, to obtain a complete dissolution. This temperature is optimal for MTG and it partially denatures gelatin network to subsequently improve cross-linking (Stachel et al. 2010). Then, MTG solubilized in phosphate buffer was added, and the mixture was stirred manually until homogenization. At the end, the gelatin was at 6.67% (w/v) (Jongjareonrak et al. 2006; Arnesen and Gildberg 2007; Mohtar et al. 2013) and MTG was tested at three concentrations: 2%, 5% and 10% (w/w gelatin) (representing 2.5, 6.25 and 12.5 U.g<sup>-1</sup> of gelatin respectively) (Table II.1). The mixtures were incubated in a water bath at 40°C for 30 min and the enzyme was inactivated by heating the samples up to 70°C for 15 min (Gomez-Guillén et al. 2001; De Carvalho and Grosso 2004). The hydrogels were left at room temperature for 20 min and then at 4°C for at least 18 h. Samples were used for measurements under hydrogel or sponge forms after a freeze-drying step.

The negative control (called native is the untreated gelatin) was made using the same procedure with phosphate buffer instead of the MTG solution. The positive control was a chemical cross-linking with 1% (v/v) GTA without heating after GTA addition. All the following tests were carried out in triplicate.

**Table II.1.** Sample codes and compositions with corresponding gelatin source, microbial transglutaminase (MTG) or glutaraldehyde (GTA) concentrations. S: salmon gelatin, P: porcine gelatin, NAT: untreated sample, MTG: enzymatically cross-linked sample (the associated number is the % of enzyme), and GTA: chemically cross-linked sample.

Sample code	Gelatin % (w/v)	MTG % (w/w protein)	GTA % (v/v)
S-NAT	6.67	-	-
S-MTG2	6.67	2	-
S-MTG5	6.67	5	-
S-MTG10	6.67	10	-
S-GTA	6.67	-	1
P-NAT	6.67	-	-
P-MTG2	6.67	2	-
P-MTG5	6.67	5	-
P-MTG10	6.67	10	-
P-GTA	6.67	-	1

#### 2.4.4. Rheological characterization

Rheological measurements were carried out in oscillatory shear on a MCR 702 MultiDrive rheometer (Anton Paar, France), following a previously proposed procedure (Mohtar et al. 2013). The storage modulus ( $G'$ ), which characterizes the elastic energy stored in the sample, and the loss modulus ( $G''$ ), which characterizes the viscous dissipation within the sample, were studied at a constant frequency of 1 Hz and at a strain amplitude of 1%, chosen in the linear regime. All viscoelastic data were analyzed with the software Anton Paar RheoCompass 1.24.

##### State transitions of native gelatins (sol-gel and gel-sol)

State transitions of native gelatins (S-NAT and P-NAT) were measured in a concentric-cylinder geometry stainless steel and titanium (17 mm diameter bob and cup, inner diameter: 16.65 mm, outer diameter: 18.08 mm, length: 25 mm, gap: 0.71 mm). Approximately 4.6 mL of 5% (w/v) gelatin solution were loaded into the geometry and a thin layer of paraffin oil was applied over the sample and the geometry to prevent drying. Sample was cooled down at a rate of  $0.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  from  $40^{\circ}\text{C}$  to about  $3^{\circ}\text{C}$  under the sample gelling temperature. Sample was maintained at the lowest temperature for 1 h in order to complete the gelling process. The melting temperature was obtained by increasing the temperature to  $40^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $0.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . The gelling point (or the sol-gel transition) and the melting point (or gel-sol transition) were determined as the cross-over points of  $G'$  and  $G''$  (Djabourov et al. 1988b).

##### Cross-linking impact on thermal resistance

Thermal resistances of native and cross-linked gelatins were carried with a sandblasted stainless steel parallel-plate geometry of 25 mm diameter. Hydrogels were prepared as previously described in Petri dishes in a layer of 1 mm thick and left at  $4^{\circ}\text{C}$  for at least 18 h. A piece of hydrogel was removed with a punch of 25 mm diameter and placed on the geometry with a 1 mm gap. A thin layer of paraffin oil was applied around the sample and the geometry. The  $G'$  and  $G''$  moduli were analyzed by heating samples from 1 to  $40^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $0.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  and the melting point was determined.

#### 2.4.5. Biochemical and structural analyses

##### Determination of cross-linking degree

The formation of covalent bonds during cross-linking was estimated by the quantification of free amines with an OPA procedure according to Nielsen et al. (2001) with slight modifications. Briefly, an OPA solution was prepared daily with 25 mL of 0.1 M sodium tetraborate, 2.5 mL of 20% (w/v) SDS,

40 mg of OPA in 1 mL of absolute ethanol, 100  $\mu$ L of BME and distilled water to a final volume of 50 mL (Church et al. 1983). Gelatin sponges (0.2 g) were solubilized in 2 mL of distilled water at 90°C for 1 h. Then, 50  $\mu$ L of the mixture were homogenized in 1 mL of OPA reagent, 250  $\mu$ L were deposited in triplicate in a 96-well microplate (Greiner Bio-One, Germany) and incubated 2 min at room temperature in the dark (Marco and Rosell 2008). The absorbance was determined at 340 nm with a spectrophotometer SPECTROstar Omega (BMG Labtech, Germany) using distilled water as control and a standard range of L-Leucine (from 0.5 to 5 mM). Cross-linking degree was calculated as:  
Cross-linking degree (%) = 100 – (% free amines compared to the native).

#### Microstructural analyses

The microstructural analyses of gelatin sponges were carried out by scanning electron microscopy (SEM) (Hitachi S-3200N, Germany) (PIMM core facility, University of Western Brittany, France). All samples (d: 26 mm  $\times$  h: 10 mm) were cut in the center in the vertical plane and were fixed to a support to be coated with gold/palladium under vacuum. Pore size measurements (n = 10 per sample with two perpendicular measurements each) were conducted randomly from SEM images (Murphy et al. 2010; Krieghoff et al. 2019; Zamani et al. 2021).

#### Chemical composition

A small piece of gelatin sponge was cut and used for Fourier-transform infrared spectrometer (FTIR) analysis with a FT/IR-4600 spectrometer and IRT-5200 microscope (Jasco, France). The reflectance signal was collected on the region from 400 to 4000  $\text{cm}^{-1}$  for 32 scans at a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 2.4.6. Material stability

##### Hydrogel stability and syneresis

The hydrogel stability and syneresis were determined by using a sample of 5 mL (diameter 2.6 cm) weighed ( $W_0$ ) and sealed on a sterile Petri dish. Samples were heated at 40°C for 24 h and 7 days. After this, hydrogels were wiped with absorbent paper to remove excess liquid and reweighed ( $W_f$ ). The syneresis percentage was calculated as follows: Syneresis (%) =  $(W_0 - W_f) / W_0 \times 100$ .

##### Sponge stability and water binding capacity

The water binding capacity was analysed for sponges according to Elango et al. (2016) with slight modifications. Briefly, the dried sample was weighed ( $W_d$ ) before being sealed in a cup containing 5 mL of phosphate buffer 0.1 M (pH 6). After shaking, the cup was heated at 40°C for 7 days.

Then, the wet sample was wiped to remove excess liquid, and weighed ( $Ww_1$ ). The sample was returned to the cup and 5 mL of fresh phosphate buffer were added to extend the test to 30 days. At the end, the wet sample was wiped and weighed again ( $Ww_2$ ). The water binding capacity was calculated as: Water binding capacity (%) =  $(Ww - Wd) / Wd \times 100$ .

#### 2.4.7. Statistical analyses

Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) from three independent trials. The significance of differences was determined by Analysis of variance (ANOVA) and the multiple comparison was performed by Tukey's test. Statistical analyses were carried out with the software R (v. 3.6.1) and data with  $P < 0.05$  were considered as statistically significant.

## 2.5. Results and discussion

### 2.5.1. Material characterization

Proximal analysis

The composition of S-NAT is presented in **Table II.2** and the sample was mainly proteins confirming the effectiveness of the extraction.

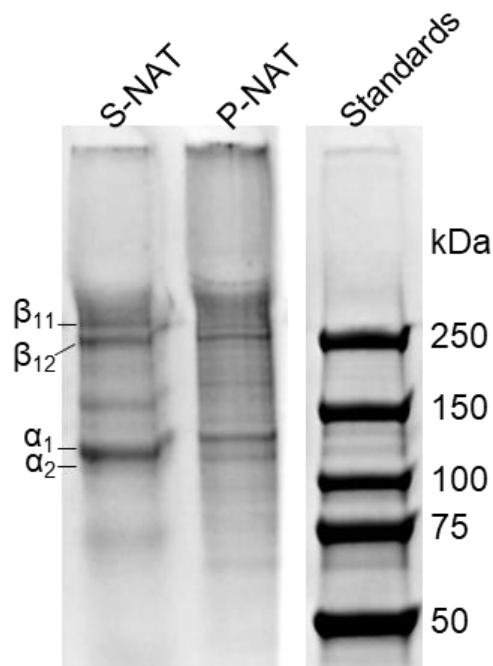
**Table II.2.** Proximal analysis results of S-NAT.

Analysis	S-NAT
Moisture (%)	7.1 $\pm$ 0.4
Fat (%)	1.2 $\pm$ 0.5
Protein (%)	108.3 $\pm$ 3.2
Ash (%)	1.9 $\pm$ 0.2

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

The first approach to characterize the native material was the determination of the molecular weight distribution of S-NAT by means of SDS-PAGE under reducing conditions in comparison to P-NAT (**Figure II.2**). Both samples displayed two bands close to 250 kDa and two close bands with molecular weights of 118 and 108 kDa for S-NAT, and 130 and 117 kDa for P-NAT. These bands are characteristic of protein patterns of gelatin from collagen type I, namely two  $\beta$ -component ( $\beta_{11}$  and  $\beta_{12}$ ) about 245 kDa and two  $\alpha$ -chains,  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ , between 101-120 kDa as previously published in literature on salmon with other extraction methods (Chiou et al. 2006; Moreno et al. 2012; Alves et al. 2017; Díaz-Calderón et al. 2017). This electrophoresis profile confirmed the presence of gelatin in the salmon

material obtained by thermal extraction and that both gelatin contained natural crosslinks by the presence of  $\beta$ -component. In fact, the  $\alpha$ -chains are the basic units of gelatin and can connect by hydrogen bonds to form a  $\beta$ -component (a dimer) or  $\gamma$ -triple helix (a trimer, not detected) (Gomez-Guillén et al. 2001; Cheng et al. 2019). The increase in temperature disturbed the gelatin structures and the addition of denaturing products broke the bonds that released the  $\beta$ -component and  $\alpha$ -chains. Both samples had an  $\alpha_1$  band more pronounced than the  $\alpha_2$  band, as there is twice more  $\alpha_1$  than  $\alpha_2$  in the triple helix (Ahmad et al. 2010). S-NAT has lower molecular weights than P-NAT which may be due to a different amino acid composition (Chiou et al. 2006; Silva et al. 2014).

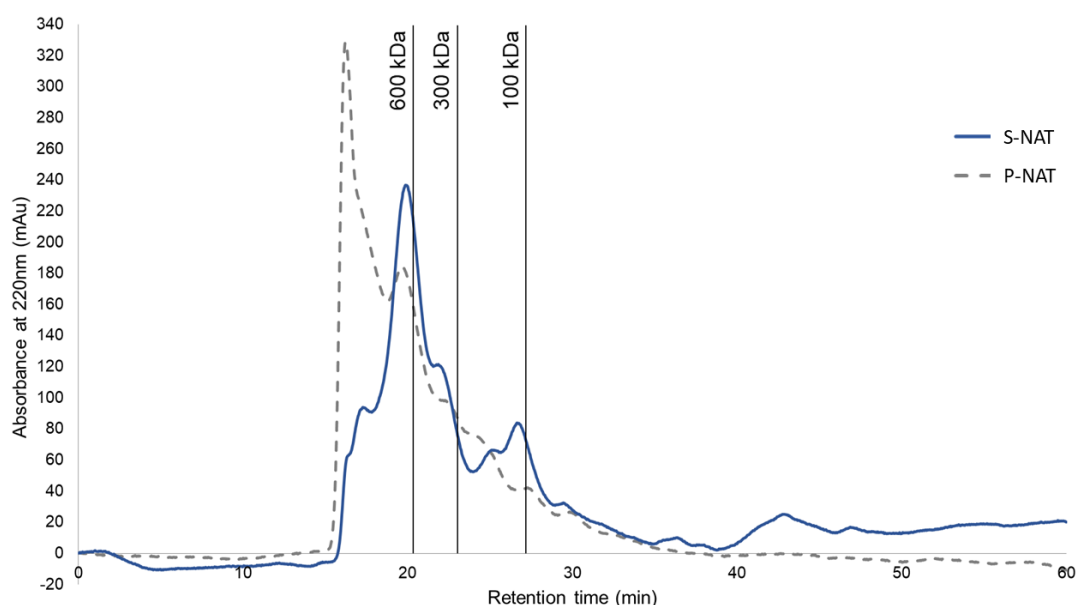


**Figure II.2.** SDS-PAGE profiles of the native gelatin samples. Lane 1: S-NAT: salmon native gelatin; lane 2: P-NAT: porcine native gelatin; lane 3: Standards (in kDa).

#### Size-exclusion chromatography

Native gelatins were characterized by SEC-HPLC to separate them on the basis of their size while preserving their conformation. The chromatographic patterns and distribution are shown in **Figure II.3** and **Table II.3**. Both gelatins presented a high proportion of molecular weight above 300 kDa, 68.57% for S-NAT and 77.07% for P-NAT. This high molecular weight of 300 kDa reflects the presence of  $\alpha$ -chain aggregates under coil or triple helix structures corresponding to a preservation of the tertiary structure of these native gelatin (Djabourov 1991; Gomez-Guillén et al. 2001; Bode et al. 2011; Cheng et al. 2019). This difference with the SDS-PAGE results can be explained by the absence of denaturing conditions, so the weak bonds and the tertiary structures were preserved. The lower content of high molecular weight of S-NAT can be explained by a lower amount of intra- and inter-

molecular cross-linked, resulting from a different amino acid composition (Haug and Draget 2011). However, non-denatured S-NAT was a promising candidate for enzymatic cross-linking as MTG produces higher molecular weight polymers by catalysing new cross-links (Huang et al. 2019).



**Figure II.3.** SEC-HPLC profiles of the native gelatin samples. S-NAT: salmon native gelatin (continuous line) and P-NAT: porcine native gelatin (dashed line).

**Table II.3.** Molecular weight (MW) distribution of the gelatin samples by SEC-HPLC. S-NAT: salmon native gelatin and P-NAT: porcine native gelatin.

MW (kDa)	Distribution (%)	
	S-NAT	P-NAT
> 600	41.81	59.84
300-600	26.76	17.23
100-300	20.01	15.03
< 100	11.42	7.90

#### Amino acid composition

The amino acid profiles of native gelatin were established in order to better understand the previous differences recorded in molecular weight distributions and the following rheological measurements (**Table II.4**). Profiles revealed a wide variety of amino acids. The main amino acids of S-NAT and P-NAT were glycine (23.10% and 21.61% respectively), proline (11.06% and 13.66% respectively) and hydroxyproline (7.24% and 11.30% respectively). Glycine was present in high concentration as this small amino acid occurs at every third amino acid in the helical domain of an  $\alpha$  chain allowing compact triple helices (Bhagwat and Dandge 2018; Huang et al. 2019). The amount of

glycine can vary between 20-36% for mammalian gelatin or cold fish gelatin (including salmon) depending on the extraction technique (Arnesen and Gildberg 2007; Eysturskard et al. 2009; Acevedo et al. 2015; Díaz-Calderón et al. 2017). Proline and hydroxyproline are the amino acids most often cited to complete the triplet sequences with glycine. These both amino acids were in a higher proportion in P-NAT (24.96% combined) than in S-NAT (18.30% combined) which is close to literature (Arnesen and Gildberg 2007; Ferraro et al. 2010; Acevedo et al. 2015). This promotes the creation of bonds and may explain the higher proportions of high molecular weight for P-NAT than for S-NAT (Gómez-Estaca et al. 2009; Ferraro et al. 2010). Moreover, proline and hydroxyproline are also considered responsible for the resistance of gelatin and a lower concentration in S-NAT than in P-NAT would imply lower thermostability and bloom degree (Gomez-Guillén et al. 2001; Silva et al. 2014; Annamalai et al. 2019; Huang et al. 2019).

**Table II.4.** Amino acid composition of native gelatin samples. S-NAT: salmon native gelatin, P-NAT: porcine native gelatin, Pro: proline, and Hyp: hydroxyproline.

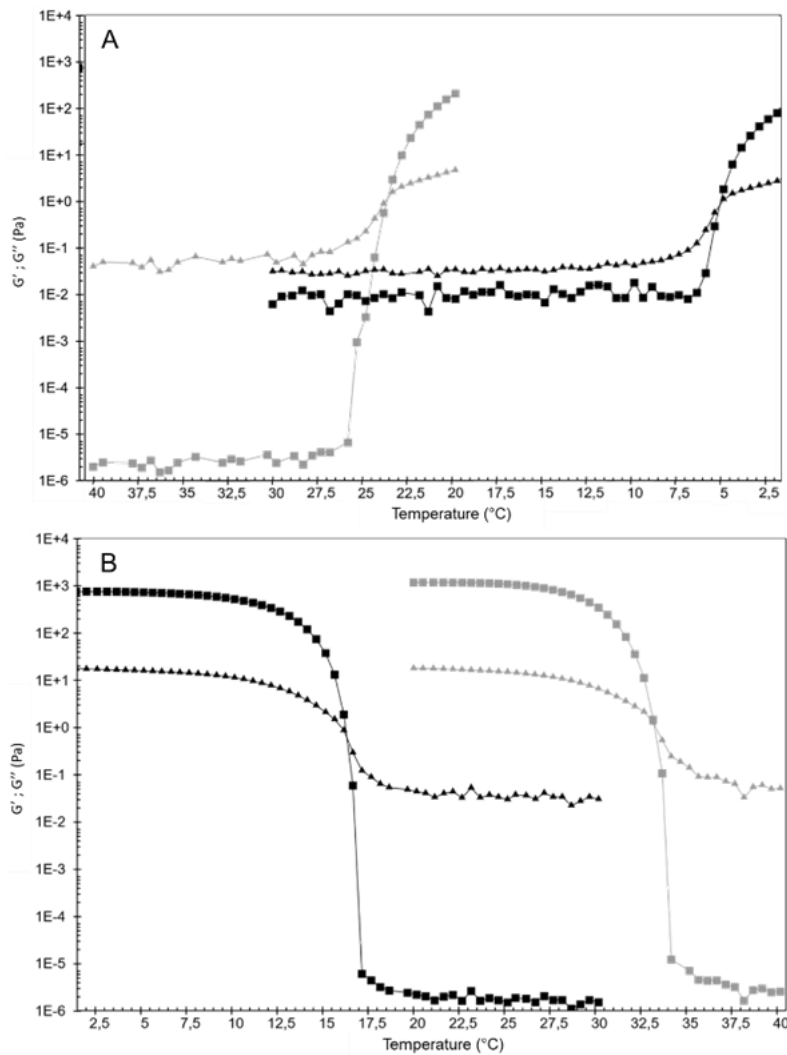
Amino acids	g/100g <sub>protein</sub>	
	S-NAT	P-NAT
Alanine	8.70 ± 0.70	8.78 ± 0.70
Arginine	7.86 ± 0.63	7.71 ± 0.62
Aspartic acid	6.18 ± 0.49	5.33 ± 0.43
Cystine	0.17 ± 0.03	0.06 ± 0.03
Glutamic acid	9.84 ± 0.79	9.91 ± 0.79
Glycine	23.10 ± 1.85	21.61 ± 1.73
Histidine	1.36 ± 0.11	0.66 ± 0.05
Hydroxylysine	1.17 ± 0.09	1.00 ± 0.08
Hydroxyproline	7.24 ± 0.58	11.3 ± 0.90
Isoleucine	1.17 ± 0.09	1.12 ± 0.09
Leucine	2.24 ± 0.18	2.75 ± 0.22
Lysine	3.22 ± 0.26	3.48 ± 0.28
Methionine	2.18 ± 0.17	0.71 ± 0.06
Phenylalanine	1.89 ± 0.15	1.99 ± 0.16
Proline	11.06 ± 0.88	13.66 ± 1.09
Serine	4.37 ± 0.35	3.22 ± 0.26
Threonine	2.33 ± 0.19	1.65 ± 0.13
Tyrosine	0.47 ± 0.04	0.80 ± 0.06
Valine	1.61 ± 0.13	2.29 ± 0.18
Pro + Hyp	18.3	24.96



### 2.5.2. Rheological results

State transitions of native gelatins (sol-gel and gel-sol)

Linear viscoelastic properties of native gelatins were measured to determine the temperatures of state transitions. Samples were first cooled and the sol-gel transition, corresponding to  $G' = G''$ , was shown to occur at  $5.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$  for S-NAT and at  $23.6 \pm 0.1^\circ\text{C}$  for P-NAT, as illustrated in **Figure II.4A**. The gelation is a non-instantaneous process; first, the gelatin molecules change from a coil conformation to a helix by the random formation of hydrogen bonds. The gel is then formed when sufficient helicoidal regions are produced (Chen and Shi 2013). Helices will grow and stabilize the structure through crystal junction zones (Achet and He 1995; Chen and Shi 2013). The time-induced gel structuration is rheologically characterized by a sharp increase of the storage modulus  $G'$ , from about 1 Pa at the gelling point for both S-NAT and P-NAT (**Figure II.4A**), to  $1146.9 \pm 952.4$  Pa for S-NAT and 1170.7 Pa for P-NAT after one hour equilibration, highlighting the significant enhancement of gel elastic properties with time (Arnesen and Gildberg 2007). Gelatin is a material with a thermoreversible nature, when heated, the material loses cohesion and a gel-sol transition is obtained. S-NAT showed a lower thermal resistance than P-NAT with melting point at  $16.7 \pm 1.1^\circ\text{C}$  and at  $33.2^\circ\text{C}$ , respectively (**Figure II.4B**). Ionic forces, pH, triple helix rate or molecular weight can impact the processes of state change (Djabourov et al. 1988a). Thus, the differences between S-NAT and P-NAT could be due to the higher amount of proline and hydroxyproline in P-NAT that are favorable to nucleation due to their stiffness (Djabourov 1988; Arnesen and Gildberg 2007). The adaptation to the body temperature has also a role in these differences as salmon is an ectothermic, living at  $6\text{-}16^\circ\text{C}$ , its temperature is lower than the temperature of terrestrial mammals (Jongjareonrak et al. 2006; Haug and Draget 2011; Diogo et al. 2021).



**Figure II.4.** Storage modulus ( $G'$  - squares) and loss modulus ( $G''$  - triangles), at a frequency of 1 Hz in the linear regime, as a function of temperature for native salmon (S-NAT - in black) and porcine gelatins (P-NAT - in grey) ( $n = 3$ ). A: gelling temperature analyses and B: melting temperatures analyses.

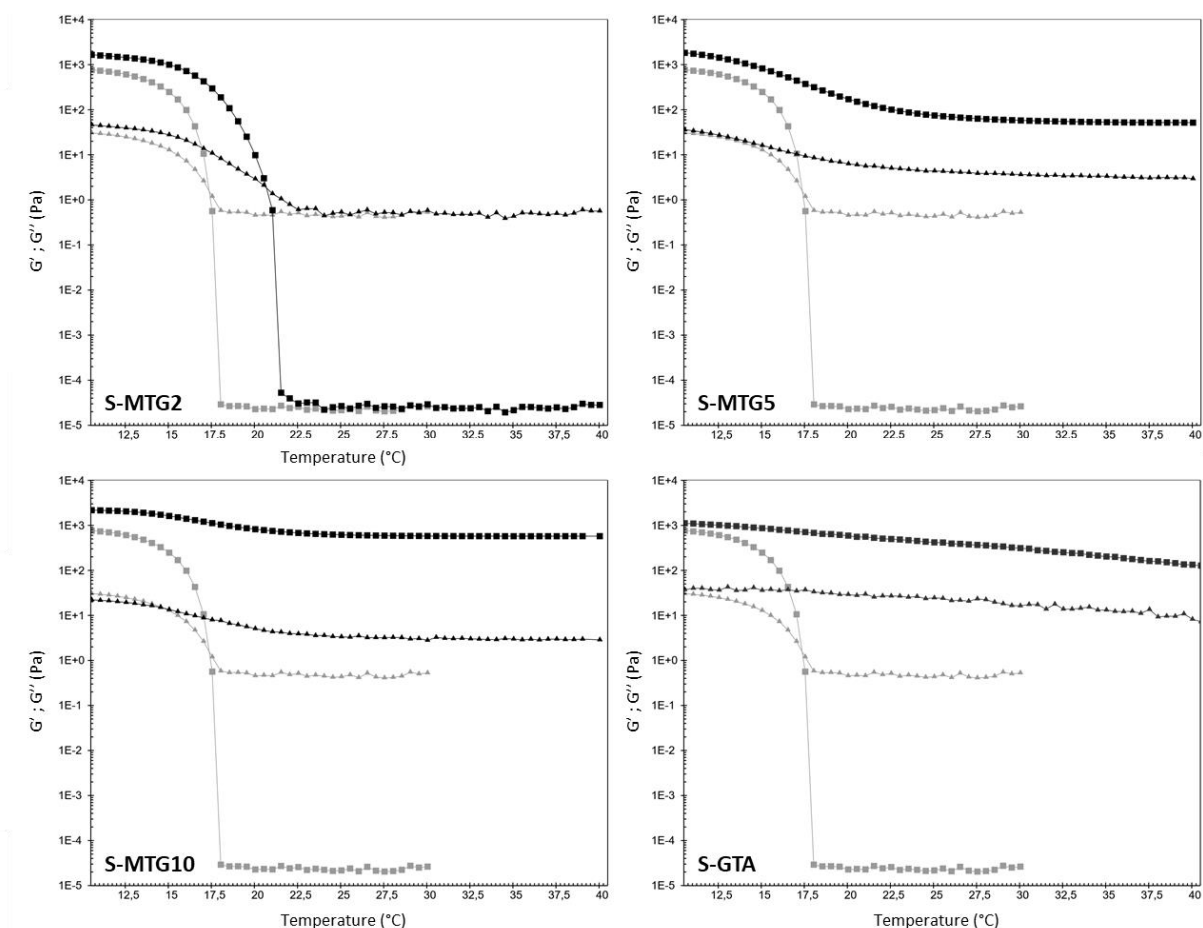
#### Cross-linking impact on thermal resistance

Sample thermal resistance after cross-linking was rheologically studied by analyzing  $G'$ ,  $G''$  as a function of temperature, as presented in **Figure II.5** and **Figure II.6**. Melting temperatures of S-NAT and S-MTG2 were respectively  $17.5 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$  and  $20.7 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ . The results showed that a weak network has developed in S-MTG2, but still not efficient enough to suppress the thermoreversibility of the material at the higher tested temperatures (**Figure II.5**). A study on the hoki fish gelatin has shown a similar increase of the melting temperature by  $4.5^{\circ}\text{C}$  with enzyme addition (Mohtar et al. 2013). The storage modulus  $G'$  of both S-MTG5 and S-MTG10 were shown to slightly decrease in the vicinity of the melting temperature of S-NAT, which could be due to the breaking of a weak physical network, with non-covalent cross-links present at low temperatures (Bode et al. 2011; Da Silva et al. 2014).

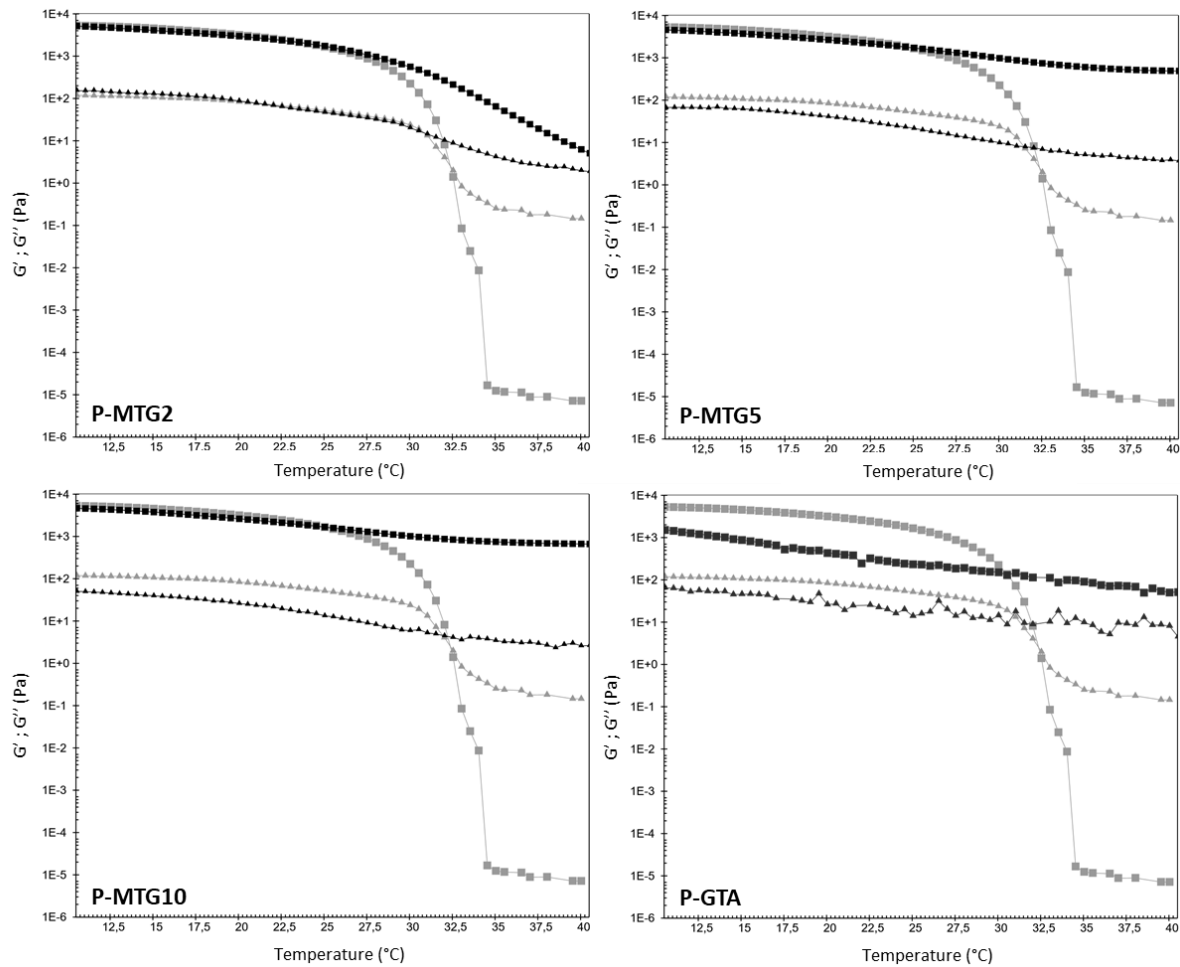
However, the results show that the elastic properties were maintained at 40°C, due to the presence of a network with covalent cross-links (De Carvalho and Djabourov 1997; Bode et al. 2011). This loss of thermoreversibility was also obtained on porcine gelatin with the three enzyme concentrations (Figure II.6). Other studies on porcine gelatin cross-linked with MTG at 10 or 12 U.g<sup>-1</sup> of gelatin, showed an increase of the melting temperature above 50°C (Chen et al. 2003; Liu et al. 2020).

For both gelatins, the results plotted in Figure II.5 and Figure II.6 showed that enzymatic cross-linking result in hydrogels that were as mechanically and thermally resistant at 40°C as hydrogels obtained by chemical cross-linking. However, the G' modulus at 40°C of S-GTA (139.2 ± 14.6 Pa) is four times lower than that of S-MTG10.

Moreover, it is interesting to note that S-MTG10 exhibited elastic properties similar to those of P-MTG5 and P-MTG10 at 40°C, meaning that, above a given enzyme concentration threshold, marine gelatin could provide similar mechanical characteristics to those of mammalian gelatin and thus be a relevant substitute.



**Figure II.5.** Storage modulus ( $G'$  - squares) and loss modulus ( $G''$  - triangles), at a frequency of 1 Hz in the linear regime, as a function of heating temperature for salmon gelatins ( $n = 3$ ). Native gelatin is represented in light grey as control. S: salmon gelatin, MTG: enzymatically cross-linked gelatin (the associated number is the % of enzyme), and GTA: chemically cross-linked gelatin.



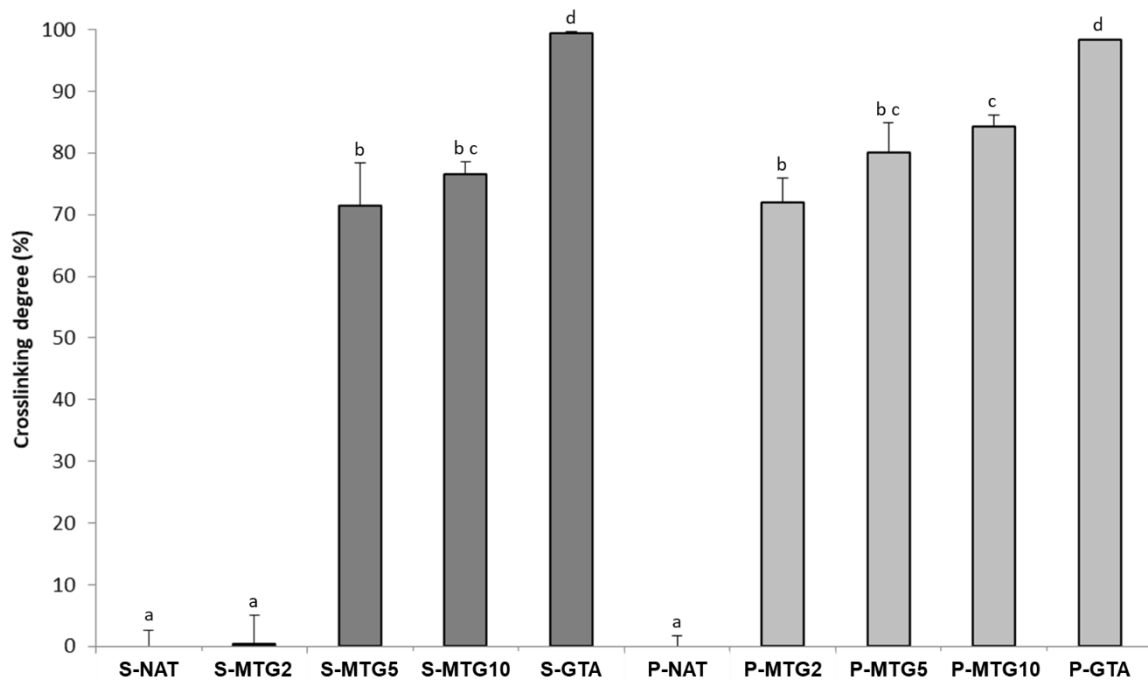
**Figure II.6.** Storage modulus ( $G'$  - squares) and loss modulus ( $G''$  - triangles), at a frequency of 1 Hz in the linear regime, as a function of heating temperature for porcine gelatins ( $n = 3$ ). Native gelatin is represented in light grey as control. P: porcine gelatin, MTG: enzymatically cross-linked gelatin (the associated number is the % of enzyme), and GTA: chemically cross-linked gelatin.

### 2.5.3. Biochemical and structural analyses

#### Determination of cross-linking degree

The sample cross-linking degrees were estimated based on the free amines in comparison to native gelatin with the OPA procedure; results are shown in **Figure II.7**. For salmon gelatin, the degree of cross-linking showed a significant increase for S-MTG5, S-MTG10 and S-GTA where covalent networks had developed to more than 70% of free amines. Overall, S-MTG5 and S-MTG10 developed a network of covalent bonds as rich as P-MTG2, P-MTG5 and even P-MTG10 for S-MTG10. Cross-linking degree seemed to reach a plateau between 70-85% at the enzyme concentrations tested. This can be explained by the progressive reduction of intermolecular space due to new covalent bonds that would have limited the mobility of the enzyme and its interaction with the entire substrate (Elango et al.

2016; Cheng et al. 2019). This is in contrast to chemical cross-linking, which was faster with the small size of the GTA and its diversity of action sites accepting more amino acids (Chatterji 1989; Barnes et al. 2007; Huang et al. 2019). The degree of cross-linking reached in our study was higher than 98%. By comparing rheology results, 70% of amino groups involved in the bonding network seem enough to obtain a cohesive and resistant material at 40°C for both gelatins.

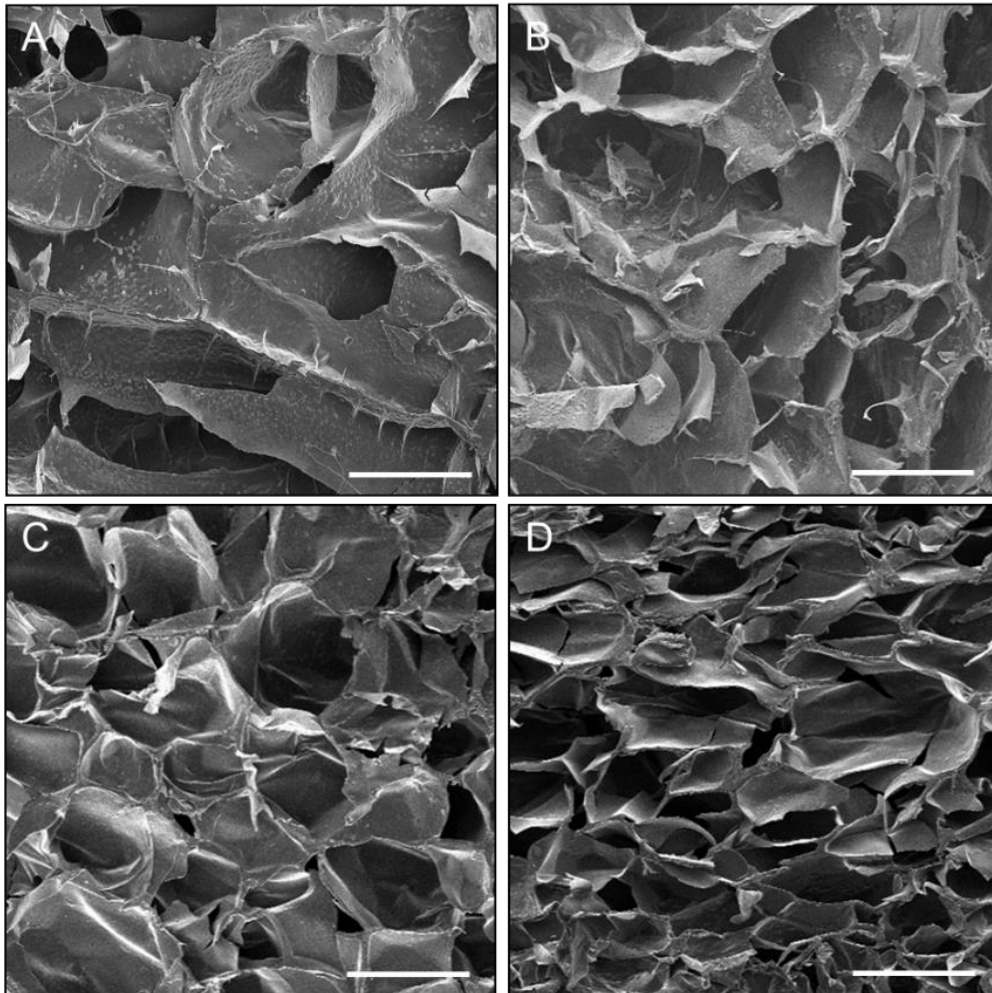


**Figure II.7.** Cross-linking degree (%) of native and cross-linked sponges for salmon (in dark grey) and porcine gelatins (in light grey) (n = 3). S: salmon gelatin, P: porcine gelatin, NAT: native gelatin, MTG: enzymatically cross-linked gelatin (the associated number is the % of enzyme), and GTA: chemically cross-linked gelatin. Different letters above the histogram bars indicate significant differences  $P < 0.05$ .

#### Microstructural analyses

Microstructural analyses of gelatin sponges are necessary to know the pore size and shape. These parameters are important as they affect the functional and mechanical properties of the material (Song et al. 2006). SEM images show that all native and enzymatically cross-linked salmon gelatins possessed porous structures with interconnected cavities (**Figure II.8**). This feature is important as it allows diffusion of oxygen, nutrients, and liquid into the matrix (Song et al. 2006; Bermueller et al. 2013). SEM image analysis was used to determine the average pore size (**Table II.5**). Pore size was significantly impacted by cross-linking in the S-MTG10 sponges. Indeed, the pores decreased from an average diameter of  $720 \pm 287 \mu\text{m}$  for S-NAT, to  $461 \pm 233 \mu\text{m}$  for S-MTG10 by the increase of the internal network. A decrease in pore size was also observed on bovine collagen

following the addition of MTG (Cheng et al. 2019). The pore size influences the diffusion within the material. For potential medical applications as tissue substitute, the diameter of S-MTG10 seems to be the most appropriate for cell development as previous studies done on mammalian collagen sponges have concluded that pores between 300 and 500  $\mu\text{m}$  are favorable to development of primary mesenchymal stem cells and osteoblasts (Murphy et al. 2016; Krieghoff et al. 2019). This diameter allows the development of tissue due to its large interface between the material and the cells. The pore shapes were irregular from round to flattened and the homogeneity of the material was increased concomitantly with the augmentation of enzyme's amount. Enzymatic cross-linking allows to modify the internal structure of the material to adapt it to the needs of future applications in terms of shape and pore size.



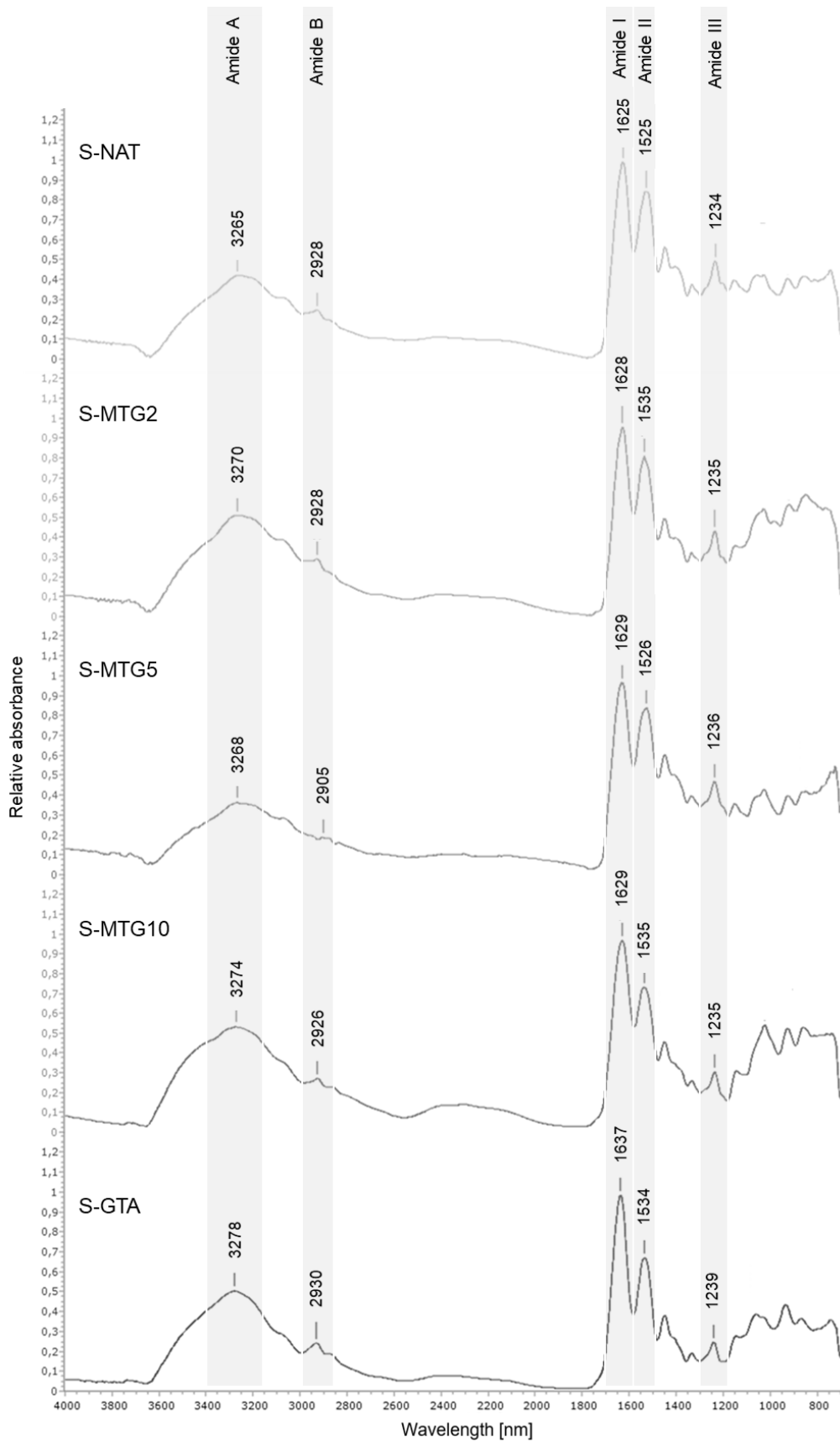
**Figure II.8.** Representative microstructures of vertical sections of gelatin sponges by SEM. (A) corresponds to S-NAT, (B) to S-MTG2, (C) to S-MTG5 and (D) to S-MTG10. S: salmon gelatin, NAT: native gelatin, and MTG: enzymatically cross-linked gelatin (the associated number is the % of enzyme). Scale bar: 1 mm.

**Table II.5.** Mean pore size ( $\mu\text{m}$ ) of salmon gelatin sponges. S: salmon gelatin, NAT: native gelatin, and MTG: enzymatically cross-linked gelatin (the associated number is the % of enzyme). Different letters next to values indicate significant differences  $P < 0.05$ .

	Mean pore size ( $\mu\text{m}$ )
S-NAT	$720 \pm 287^a$
S-MTG2	$672 \pm 277^a$
S-MTG5	$630 \pm 196^a$
S-MTG10	$461 \pm 233^b$

#### Chemical composition

The chemical structures of the sponges were analyzed by FTIR to observe the changes brought by cross-linking (**Figure II.9**). The sponges had a protein structure characterized by amide peaks. The peaks were located as follows: amide I about 1700-1600 nm (corresponds to C=O stretching vibrations), amide II about 1590-1500 nm (corresponds to C-N stretching coupled with N-H bending), amide III about 1200 nm (corresponds to C-N stretching coupled with N-H bending), amide A about 3295 nm (corresponds to N-H stretching coupled with hydrogen bond) and amide B about 2900-2920 nm (corresponds to CH<sub>3</sub> and CH<sub>2</sub> asymmetric stretching) (Ahmad et al. 2017; Cheng et al. 2019). The wavelengths of the peaks did not vary significantly between samples in contrast to their relative absorbance (**Table II.6**). The major differences appeared to be on amides II and III with decreases in absorbance for S-MTG10 and S-GTA. The absorbance decrease for amide II reflects a change from NH<sub>2</sub> to NH through the creation of covalent intermolecular bonds between gelatin molecules for enzymatic cross-linking or between gelatin molecules and GTA for chemical cross-linking (Chen et al. 2014). The absorbance decrease for amide III reflects a decrease in the amount of triple helices. The creation of new covalent bonds disrupted the formation of triple helices during cooling, which remained partially coiled (Cheng et al. 2019). Furthermore, it has been shown that an amide III and 1450 nm ratio close to 1 indicates a triple helix structure, but this ratio decreased, in comparison to the native gelatin, when the enzyme concentration increased, proving the partial loss of the triple helices (Ahmad et al. 2010; Zhang et al. 2016). The rheological differences between S-MTG5 and S-MTG10 seemed to be explained by a different internal chemical structure, the covalent bonds were not formed in the same way. It appears that S-MTG5 had an intramolecular network with triple helix structures formed by covalent bonds because amide II and III absorbances were close to those of S-NAT while S-MTG5 had acquired high thermal and mechanical resistances.



**Figure II.9.** FTIR spectra of the native and cross-linked samples of salmon gelatin ( $n = 3$ ). S: salmon gelatin, NAT: native gelatin, MTG: enzymatically cross-linked gelatin (the associated number is the % of enzyme), and GTA: chemically cross-linked gelatin.



**Table II.6.** FTIR relative absorbance of the native and cross-linked samples of salmon gelatin (n = 3). S: salmon gelatin, NAT: native gelatin, MTG: enzymatically cross-linked gelatin (the associated number is the % of enzyme), and GTA: chemically cross-linked gelatin.

Peaks	Relative absorbance				
	S-NAT	S-MTG2	S-MTG5	S-MTG10	S-GTA
Amide I	0.99	0.96	0.97	0.97	0.99
Amide II	0.84	0.81	0.84	0.73	0.67
Amide III	0.49	0.43	0.47	0.31	0.25
Amide A	0.42	0.51	0.36	0.53	0.50
Amide B	0.25	0.29	0.19	0.27	0.24
Ratio amide III / 1450 nm	0.88	0.86	0.78	0.67	0.65

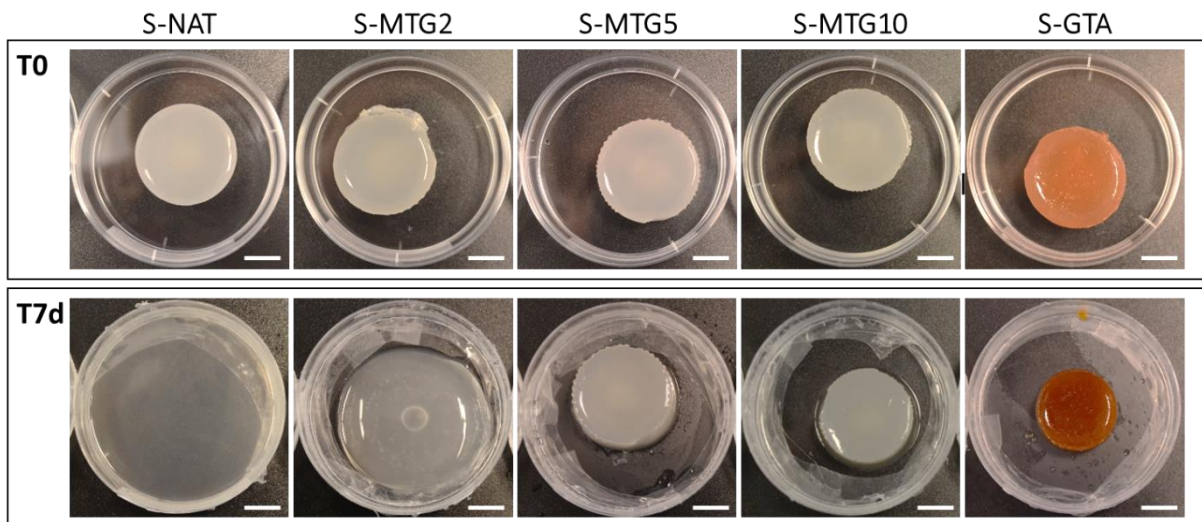
#### 2.5.4. Biomaterial stability

##### Hydrogel stability and syneresis

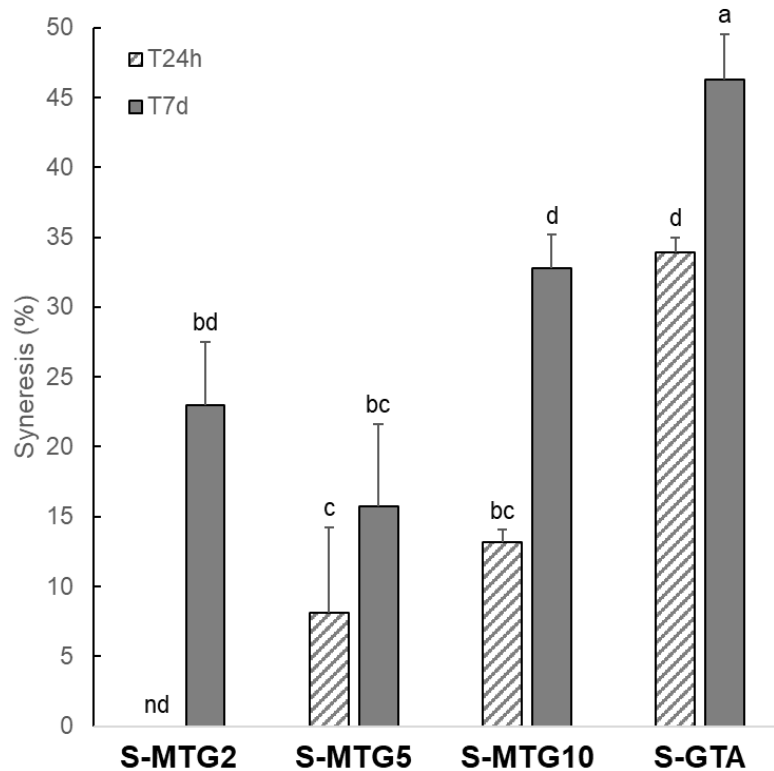
The hydrogels were macroscopically identical with the exception of S-GTA that showed an orange color in contrast to the white color of the others (**Figure II.10**). This coloration is due to the consumption of aldehyde groups during chemical cross-linking, which does not occur with the enzyme (Chatterji 1989; Tian et al. 2016).

The hydrogels were maintained for 7 days at 40°C to mimic ageing of the material in order to observe their stability on a longer period and with larger samples than rheological analyses (**Figure II.10**). Their ability to retain their hydration was also analyzed (**Figure II.11**). Indeed, in some domains of applications such as wound healing dressing or more broadly in tissue engineering, it is necessary for a hydrogel to maintain its structure as well as its hydration, because this influences the permeability to nutrients and potentially its biocompatibility (Zhao et al. 2016). S-NAT was completely liquefied in less than 1h30 that confirmed its thermoreversible ability. S-MTG2 remained solid at 40°C, contrary to rheological analyses for 7 days (**Figure II.5**). Possible explanations for this are the absence of applied mechanical stress, the higher thickness of the sample or the slight drying of the hydrogel surface that maintained the structure. However, the structure of S-MTG2 was not completely cohesive; it was difficult to handle due to a high viscosity. S-MTG5, S-MTG10 and S-GTA retained their original gel form, which confirmed their acquisition of a durable thermal resistance. However, S-MTG5 and S-MTG10 had different behaviors at the end of the test, S-MTG5 was viscous and sticky while S-MTG10 was more rigid and not sticky that can be explained by the FTIR data, which showed different modifications in chemical structures (**Figure II.9**).

Concerning syneresis, S-MTG5 showed the lowest rates (around 8-15%) which did not vary significantly over the analysis period (**Figure II.11**). S-MTG10 released more liquid after 7 days showing a more developed hydrophobicity, because during the cross-linking reaction, hydrophilic amino acids of the gelatin were used to form the bonds (Liu et al. 2020). This hydrophobic effect was accentuated for S-GTA with higher and faster syneresis (34% in 24 h and 46% in 7 days) due to its higher cross-linking degree (Chen et al. 2014). These differences in behavior can offer versatility in applications to the material depending on the amount of enzyme used.



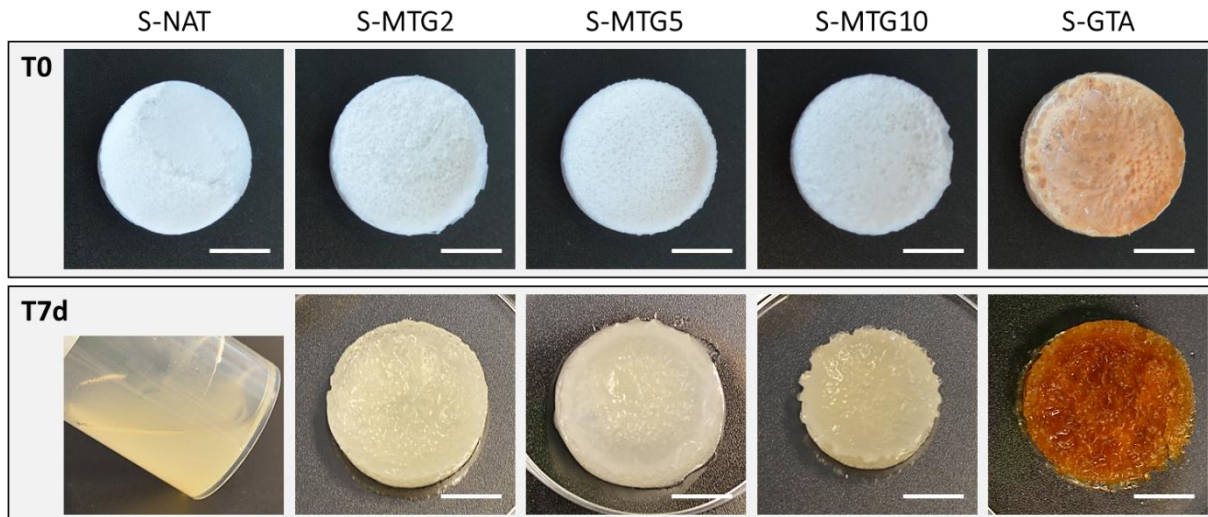
**Figure II.10.** Macroscopic demonstration of hydrogel stability after 7 days at 40°C (n = 3). S: salmon gelatin, NAT: native gelatin, MTG: enzymatically cross-linked gelatin (the associated number is the % of enzyme), and GTA: chemically cross-linked gelatin. Scale bar: 1 cm.



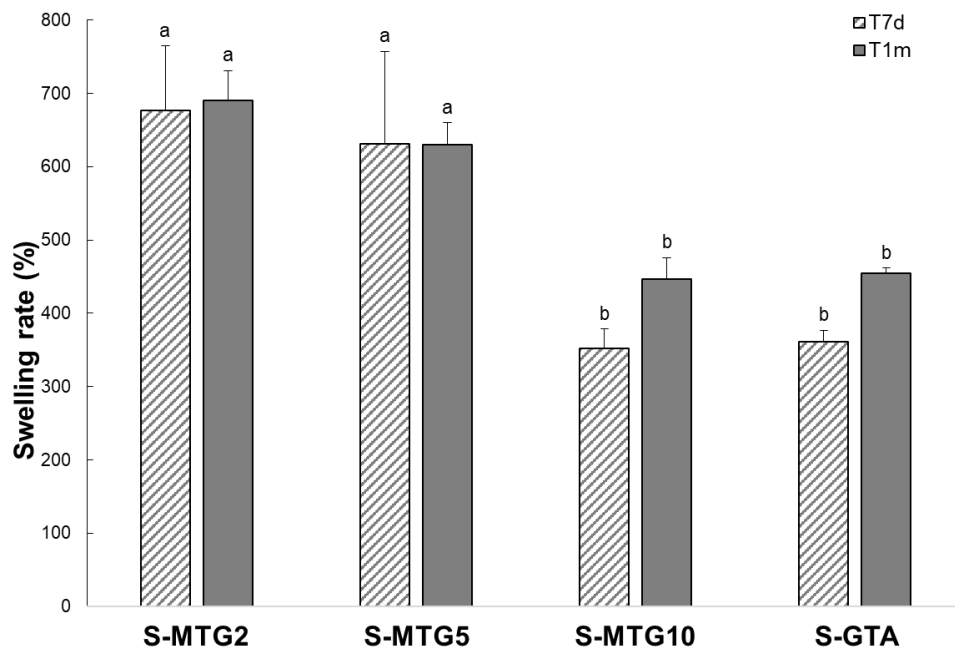
**Figure II.11.** Syneresis rate (%) of cross-linked salmon gelatin hydrogels after 24 h (T24h - hatched bars) and 7 days (T7d - filled bars) at 40°C (n = 3). S: salmon gelatin, MTG: enzymatically cross-linked gelatin (the associated number is the % of enzyme), and GTA: chemically cross-linked gelatin. Different letters above the histogram bars indicate significant differences  $P < 0.05$ . nd: not determined.

#### Sponge stability and water binding capacity

The stability of the gelatin sponges in rehydration conditions at 40°C was assessed in order to better understand the impact of freeze-drying (**Figure II.12**). All the cross-linked sponges retained a solid state over the period of analysis, including S-MTG2, which implies that freeze-drying strengthened its structure (Schoof et al. 2001; Buttafoco et al. 2006). Buffer turnover during the analysis did not affect the swelling rates as shown in **Figure II.13**. S-MTG2 and S-MTG5 showed swelling rates of 630-690% while lower water binding capacities were observed for S-MTG10 and S-GTA with swelling rates of 350-450%. Their higher hydrophobic abilities are explained by the increase of their molecular weights due to the formation of covalent bonds and the loss of hydrophilic sites (Chen et al. 2014; Huang et al. 2019; Liu et al. 2020). These different degrees of water binding capacities are promising. Indeed, the materials could go through a freeze-drying step to facilitate their preservation and then be rehydrated before its use.



**Figure II.12.** Macroscopic demonstration of sponge stability after 7 days in hydrated conditions at 40°C (n = 3). S: salmon gelatin, NAT: native gelatin, MTG: enzymatically cross-linked gelatin (the associated number is the % of enzyme), and GTA: chemically cross-linked gelatin. Scale bar: 1 cm.



**Figure II.13.** Swelling rate (%) of cross-linked salmon gelatin sponge after 7 days (T7d - hatched bars) and 1 month (T1m - filled bars) in hydrated conditions at 40°C (n = 3). S: salmon gelatin, MTG: enzymatically cross-linked gelatin (the associated number is the % of enzyme), and GTA: chemically cross-linked gelatin. Different letters above the histogram bars indicate significant differences  $P < 0.05$ .

## 2.6. Conclusion

This study demonstrated the effect of enzymatic cross-linking by microbial transglutaminase (MTG) on Atlantic salmon skin gelatin. The result was a potential porous gelatin-based biomaterial for various applications by its structure, its mechanical and thermal resistances and its water conservation capacity. This enzyme-assisted modification improved the mechanical and thermal resistances of the gelatin. Depending on the amount of enzyme used, it was possible to adapt the properties of the biomaterial to different potential applications. A cross-linking with 5% enzyme allowed the development of a sticky and viscous material that may be interesting as cosmetic patch or wound healing dressing, while the addition of 10% enzyme allowed to obtain a rigid and non-sticky material interesting as packaging for food or scaffold for tissue engineering. Moreover, both biomaterials were resistant to temperatures above 40°C and to rehydration. This work is a premise for future work that should focus on cellular analysis to test its ability to support bone-marrow mesenchymal stem cells survival and its biocompatibility, as well as its degradation. Complementary mechanical tests such as compressive and tensile strength analyses must also be performed to use it in the medical field as tissue substitute.

### **CRediT authorship contribution statement**

**Buscaglia M.:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - Original draft preparation and Writing - Review & Editing. **Guerard F.:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - Review & Editing, Supervision and Funding acquisition. **Roquefort P.:** Methodology, Investigation and Formal analysis. **Aubry T.:** Conceptualization, Writing - Review & Editing. **Fauchon M.:** Investigation. **Toueix Y.:** Investigation. **Stiger-Pouvreau V.:** Writing - Review & Editing, Supervision and Funding acquisition. **Hellio C.:** Writing - Review & Editing, Supervision and Funding acquisition. **Le Blay G.:** Writing - Review & Editing, Supervision and Funding acquisition.

### **Declaration of competing interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### **Acknowledgments**

This study was financially supported by the European Union through the INTERREG Atlantic Programme, under the scope of BLUEHUMAN (EAPA\_151/2016) project. This work was also supported by Biogenouest through the Biodimar team (LEMAR, UBO). The PhD fellowship of Manon Buscaglia

was funded by the Conseil Regional de Bretagne and the European Union through the INTERREG Atlantic Programme, under the scope of BLUEHUMAN (EAPA\_151/2016).

### References

All references are listed at the end of the manuscript to facilitate reading, see the references section on page 209.

### 3. OPTIMISATION ET ANALYSES COMPLEMENTAIRES

#### 3.1. Clarification du collagène

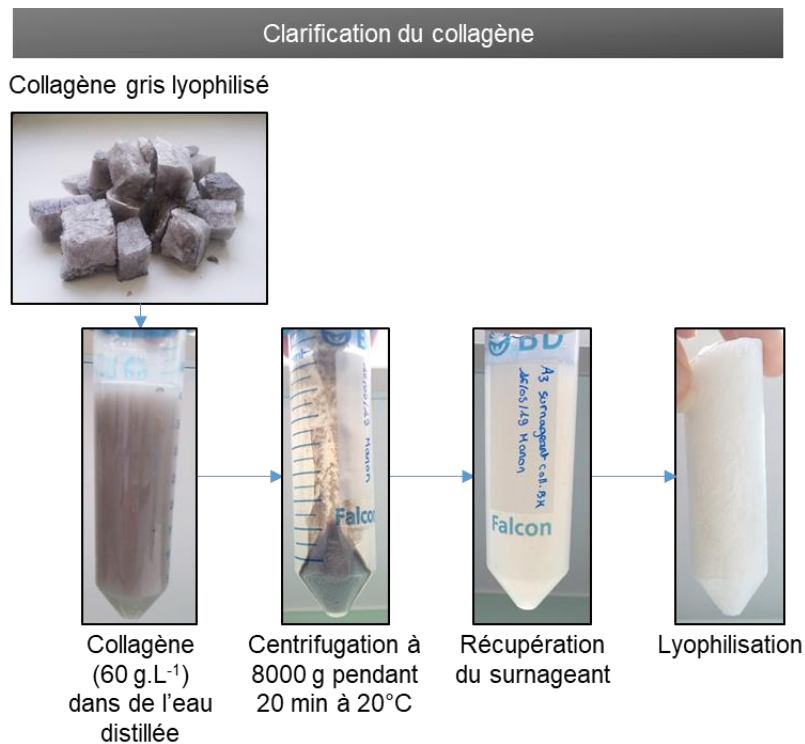
Le collagène fourni par le partenaire YSLAB associé au projet BLUEHUMAN présentait une coloration grise résultant de la présence de résidus de peau insolubles. Il a donc été nécessaire d'ajouter une étape de clarification, après la lyophilisation du collagène gris, en testant cinq tampons de solubilisation et une centrifugation (8000 g, 20 min à 20°C) afin de choisir le protocole adéquat (**Tableau II.7**). Les surnageants des différentes solutions à base de collagène ont ensuite été analysés par SEC-HPLC et comparés au collagène solubilisé dans de l'eau distillée sans étape de centrifugation (contrôle). L'objectif était de vérifier l'impact de la clarification sur la distribution du poids moléculaire du collagène.

**Tableau II.7.** Tampons testés pour la clarification du collagène de saumon.

	Eau distillée	Eau acidifiée (par HCl 0,5M)	Tampon acétate	Tampon acétate	Tampon phosphate
Molarité du tampon	-	-	0,1M	0,2M	0,1M
pH tampon	6,68	3,03	2,98	2,98	6,01
pH avec le collagène	7,55	7,02 (réduit à 3,1)	4,28	4,13	6,1
Profil SEC-HPLC	Validé	Validé	Validé	Validé	Validé

Tous les tampons permettent une solubilisation du collagène gris et n'impactent pas la distribution des poids moléculaires, tandis que les impuretés insolubles ont été retirées. Le protocole de clarification choisi a finalement été la solubilisation dans de l'eau distillée car le profil SEC-HPLC était celui d'un collagène de haut poids moléculaire et la solution présentait la coloration blanche attendue (**Figure II.14**). Par ailleurs, cela permet de lyophiliser le matériel sans résidus de tampons afin de le conserver jusqu'à utilisation. Le rendement massique de cette clarification a été d'environ 92%.

NB : Une purification par filtration sur filtre seringue PTFE de 0,22 µm a été testée et a donné des résultats concluants avec une solution limpide, cependant, les quantités de collagène nécessaires à l'étude ne pouvaient pas être filtrées au laboratoire par cette méthode.



**Figure II.14.** Protocole de clarification du collagène de saumon obtenu par solubilisation dans de l'eau distillée et centrifugation

Par la suite, le tampon phosphate 0,1M pH 6 a été sélectionné pour la réaction de réticulation sur le collagène clarifié, car il permet de tamponner la solution à pH 6 (valeur optimale pour le bon fonctionnement de l'enzyme), sans entraîner la dénaturation du collagène.

### 3.2. Optimisation du protocole

L'approche analytique retenue pour déterminer l'efficacité de la réticulation combine à la fois l'étude des propriétés rhéologiques et de la microstructure des matrices de collagène formées afin de voir l'impact de la concentration en enzyme.

L'enzyme fournie par BDF ingrédients (Gérone, Espagne) présente une activité commerciale de 125 U.g<sup>-1</sup> d'enzyme. Les concentrations d'enzyme testées 2%, 5% et 10% correspondent respectivement à 2,5 ; 6,25 et 12,5 U.g<sup>-1</sup> de collagène (De Carvalho and Grosso 2004; Bode et al. 2011; Da Silva et al. 2014). Nous avons choisi comme témoins positifs, d'une part, une réticulation chimique avec 1% de GTA afin de valider la possibilité de réticulation des collagènes, et d'autre part, un collagène de porc afin de comparer l'effet de la réticulation enzymatique sur différents collagènes.



La procédure de réticulation (cf. **Figure II.1**, page 81) a été optimisée sur plusieurs points :

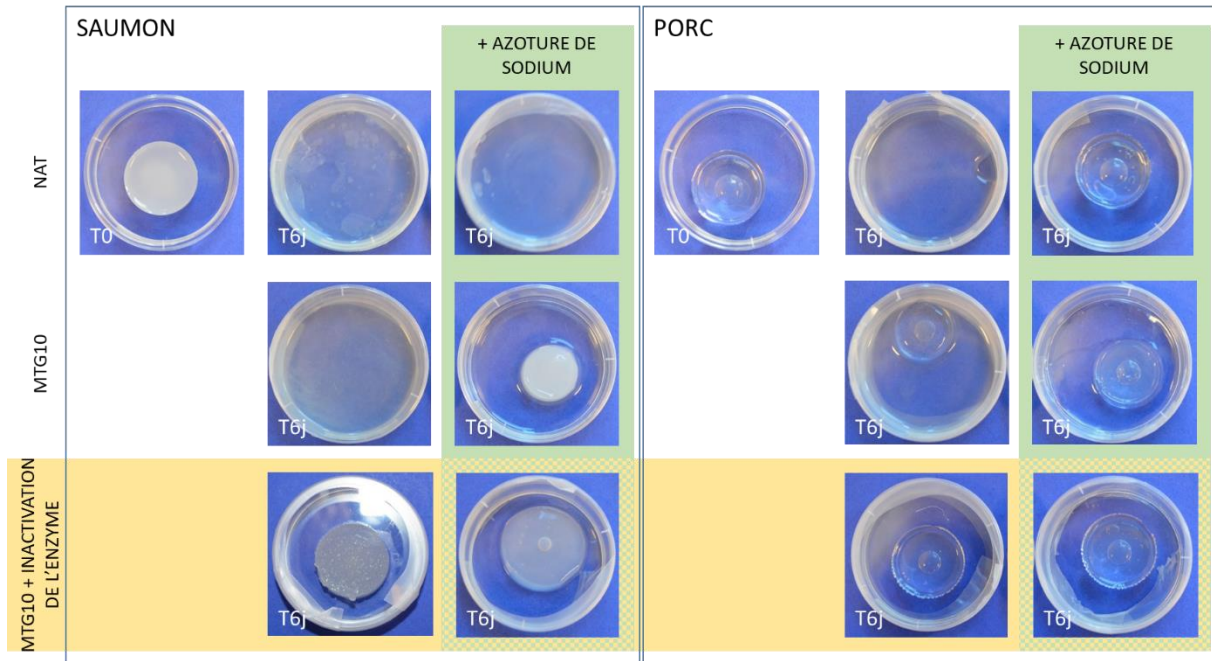
1 - La concentration en collagène a été fixée à 6,67% pour tous les tests car c'est une concentration standard pour les tests de résistance des matériaux (Jongjareonrak et al. 2006; Arnesen and Gildberg 2007; Mohtar et al. 2013). Ainsi, toutes les analyses concernent des hydrogels et des éponges réalisées dans les mêmes conditions.

2 – Le mélange enzyme-collagène a été incubé à 40°C afin de relâcher partiellement la triple hélice, ce qui augmente le nombre de sites d'interaction de l'enzyme car une grande partie de ces sites sont au cœur de la triple hélice (Stachel et al. 2010; Cheng et al. 2019).

3 - Le niveau de contamination du collagène de saumon lyophilisé fourni par le partenaire a été analysé par un sous-traitant de la société Upsciences. Les résultats de l'analyse microbiologique indiquent une contamination par des entérobactéries (< 10 UFC.g<sup>-1</sup>), des germes aérobies (1300 UFC.g<sup>-1</sup>), des levures et moisissures (80 UFC.g<sup>-1</sup>). En revanche, aucune salmonelle n'a été détectée. C'est pourquoi de l'azotate de sodium à 0,02% a été ajouté au tampon phosphate pour limiter les risques de prolifération bactérienne pouvant impacter les matrices (Ries 1978; Mirahmadi et al. 2019; Naffa et al. 2019).

4 - Une étape d'inactivation de l'enzyme a également été ajoutée après l'incubation : un traitement thermique a été appliqué pendant 10 min à 70°C comme suggéré par différents auteurs (Gomez-Guillén et al. 2001; De Carvalho and Grosso 2004). Cette étape est nécessaire car malgré le passage au froid, l'enzyme peut se réactiver une fois l'hydrogel chauffé. Cela a d'abord été observé au cours d'un test de stabilité réalisé à température ambiante et à 40°C (Buscaglia, *datas non présentées*). En effet, les hydrogels placés à température ambiante se liquéfiaient en 48h, malgré l'ajout d'une dose d'enzyme à 10% et ceux placés à 40°C conservaient parfaitement leur forme. Ces résultats pouvaient s'expliquer par : une réticulation incomplète ; une réactivation de l'enzyme et donc une prolongation de la réticulation ; d'une détérioration causée par l'enzyme ; ou une perturbation et dégradation du réseau protéique causées par les bactéries présentes (cette possibilité a depuis été éliminée par l'ajout d'azotate de sodium). La réactivation de l'enzyme a pu être observée durant un test rhéologique avec des augmentations des G' et G'' par chauffage des hydrogels (Buscaglia, *datas non présentées*). En plus de stopper la réaction, il semblerait que le passage à 70°C stimule l'activité enzymatique améliorant la fin de la réticulation.

Les modifications 3 et 4 ont été vérifiées sur nos échantillons pendant 6 jours à température ambiante dans des contenants scellés pour éviter le séchage des échantillons (**Figure II.15**).



**Figure II.15.** Effet de l'ajout d'azoture de sodium à 0,02% et de l'étape d'inactivation d'enzyme sur les hydrogels MTG10 après 6 jours à température ambiante (17-20°C) dans des contenants scellés. NAT : collagène non-traité, MTG10 : collagène réticulé avec 10% d'enzyme.

D'après nos observations, l'ajout d'azoture de sodium associé à l'inactivation de l'enzyme permettent d'obtenir des hydrogels stables dans le temps au moins 6 jours sans prolifération bactérienne détectable à la surface des échantillons. Une analyse de la cytotoxicité des hydrogels contenant de l'azoture de sodium devra toutefois être réalisée sur différents lignées cellulaires humaines, car il s'agit d'un composé très toxique. Si une cytotoxicité était avérée, il ne faudrait conserver que l'inactivation par traitement thermique de l'enzyme dans le procédé, car ce traitement suffit pour l'obtention d'hydrogels conservant dans le temps leur structure solide. La prolifération bactérienne pourrait être maîtrisée en travaillant sur un matériel collagénique stérile ou extrait après un prétraitement acido-basique qui réduit considérablement la charge bactérienne (Charpentier et al. 2016).

### 3.3. Analyses complémentaires non exploitables

Au cours de ces travaux de thèse, d'autres analyses préliminaires ont été menées sur les matrices, jusqu'alors sans résultats exploitables et nécessitant des optimisations futures.

Une analyse préliminaire par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) a été débutée en collaboration avec Catherine Charles au laboratoire CEMCA UMR 6521 à l'UBO. Cette méthode aurait permis de déterminer les températures de transition vitreuse des échantillons plus rapidement qu'en

rhéologie par mesure des échanges thermiques au sein de l'échantillon, cependant, les signaux étaient trop faibles pour être analysés. Cette méthode doit donc être ajustée pour nos biomatériaux en faisant varier les paramètres tels que la quantité d'échantillon ou la vitesse de chauffe, par exemple.

Une analyse structurale par tomographie a été réalisée par la société Sematec afin de caractériser la structure tridimensionnelle des éponges et ainsi, déterminer la porosité et la taille des pores en fonction du degré de réticulation. Cependant, notre matériau n'était pas assez dense pour que les images soient exploitables.

#### 3.4. Analyses prévues mais non réalisées par défaillance de partenaires

Dans le projet BLUEHUMAN, des analyses sur la capacité des matrices à pouvoir soutenir le développement cellulaire et leur dégradabilité devaient être réalisées par les partenaires, cependant, les circonstances sanitaires n'ont pas permis de mener à bien cette partie de l'étude. Toutes ces analyses restent ainsi à faire afin d'évaluer les capacités d'ostéoinduction, d'ostéoconduction et d'ostéointégration des biomatériaux mis au point dans le cadre de la thèse.

La cytotoxicité des biomatériaux devait également être testée par un partenaire, cependant, par défaillance de l'implication du partenaire, l'étude n'a pas pu être conduite. Il sera donc nécessaire qu'une telle étude soit menée afin d'augmenter les applications des biomatériaux notamment dans le domaine biomédical.

#### 3.5. Autre source de collagène marin analysée

Dans le cadre du projet BLUEHUMAN, une autre source de collagène marin a été testée, à savoir du collagène de peau de requin bleu (*Prionace glauca*) fourni par le partenaire IIM-CSIC (Vigo, Espagne). Le protocole de réticulation testé sur ce collagène a été le même que celui présenté précédemment (cf. **Figure II.1**, page 81). Les concentrations d'enzyme testées ont été augmentées jusqu'à 50%, cependant, seule la réticulation chimique a fonctionné. Une clarification du collagène de requin, identique à celle utilisée pour le collagène de saumon a été réalisée mais cela n'a pas permis la réticulation enzymatique. La quantité de collagène de requin fournie était trop faible et le temps étant limité, l'optimisation n'a pas pu être poursuivie. Ainsi, la technique de réticulation proposée dans ces travaux n'est pas applicable telle quelle pour toutes les sources de collagène.

#### **4. CONCLUSION**

Dans ce chapitre, le potentiel du collagène de peau de saumon atlantique (*S. salar*) en tant que biomatériau réticulé par MTG a été démontré pour la première fois. Sa résistance thermique, sa résistance aux cisaillements, sa microstructure, sa structure chimique et sa stabilité macroscopique à moyen terme ont également été caractérisées. Le processus de réticulation enzymatique optimisé a ainsi permis le développement de matériaux cohésifs et résistants, dont les propriétés mécaniques sont comparables à celles du collagène de mammifère, et également, à celles du collagène réticulé chimiquement. Deux prototypes en sont ressortis, un prototype élastique et collant pouvant correspondre aux attentes d'un matériau pour des applications en cosmétique ou en pansement tissulaire, et un prototype plus cohésif et rigide pouvant correspondre aux applications pour des emballages ou des substituts biomimétiques de tissus durs tels que les os. Ces différentes applications doivent être confirmées par des études complémentaires, notamment (1) la résistance à la compression et à la tension, et (2) la capacité des hydrogels à soutenir le développement cellulaire ou leur dégradation par les cellules au profit d'un tissu osseux néoformé. De plus, la source de collagène marin permet, certes, la valorisation de coproduits de l'industrie alimentaire mais, il sera probablement nécessaire de modifier les procédés de collecte et de traitements des peaux pour assurer l'extraction d'un collagène de qualité, dont la traçabilité est garantie, et réduire les possibilités de contamination microbienne.

Le biomatériau formé selon le protocole proposé dans cette partie pourra être associé à différentes molécules afin d'être fonctionnalisé pour répondre aux besoins des applications précédemment évoquées. Il est envisageable de l'associer à des molécules ostéogéniques et/ou antibactériennes pour son utilisation en ingénierie tissulaire osseuse. Des molécules de ce type sont recherchées dans les Chapitres III et IV.

### A RETENIR

Un nouveau procédé enzymatique de réticulation, par une transglutaminase microbienne, d'un collagène marin extrait de peaux de saumon a été optimisé. Il a permis d'obtenir des hydrogels stables dans le temps dont les propriétés ont été comparées à celles d'un hydrogel obtenu par un procédé classique de réticulation chimique par le glutaraldéhyde.

Le choix de la concentration en MTG a permis d'obtenir deux types de biomatériaux à base de collagène de saumon: un matériau souple et collant avec 5% de MTG et un matériau plus rigide avec 10% de MTG, ce qui pourrait permettre d'élargir les champs d'applications (pansement et patch, pour les gels souples vs emballages et biomatériau pour l'ingénierie tissulaire pour les plus rigides).

Après réticulation par la MTG, les gels à base de collagène de saumon présentent un ensemble de propriétés mécaniques qui permettent d'envisager qu'ils pourraient concurrencer le collagène de mammifère réticulé par la MTG, sans présenter les risques de zoonose ou les freins culturels associés au collagène de mammifère.

Le collagène de saumon peut donc être une source alternative au collagène de mammifère.







---

# CHAPITRE III

COMPOSES PHENOLIQUES BIOACTIFS ISSUS  
DE VEGETAUX MARINS ET ISOLES PAR UN  
PROCEDE D'EXTRACTION CONVENTIONNEL

---



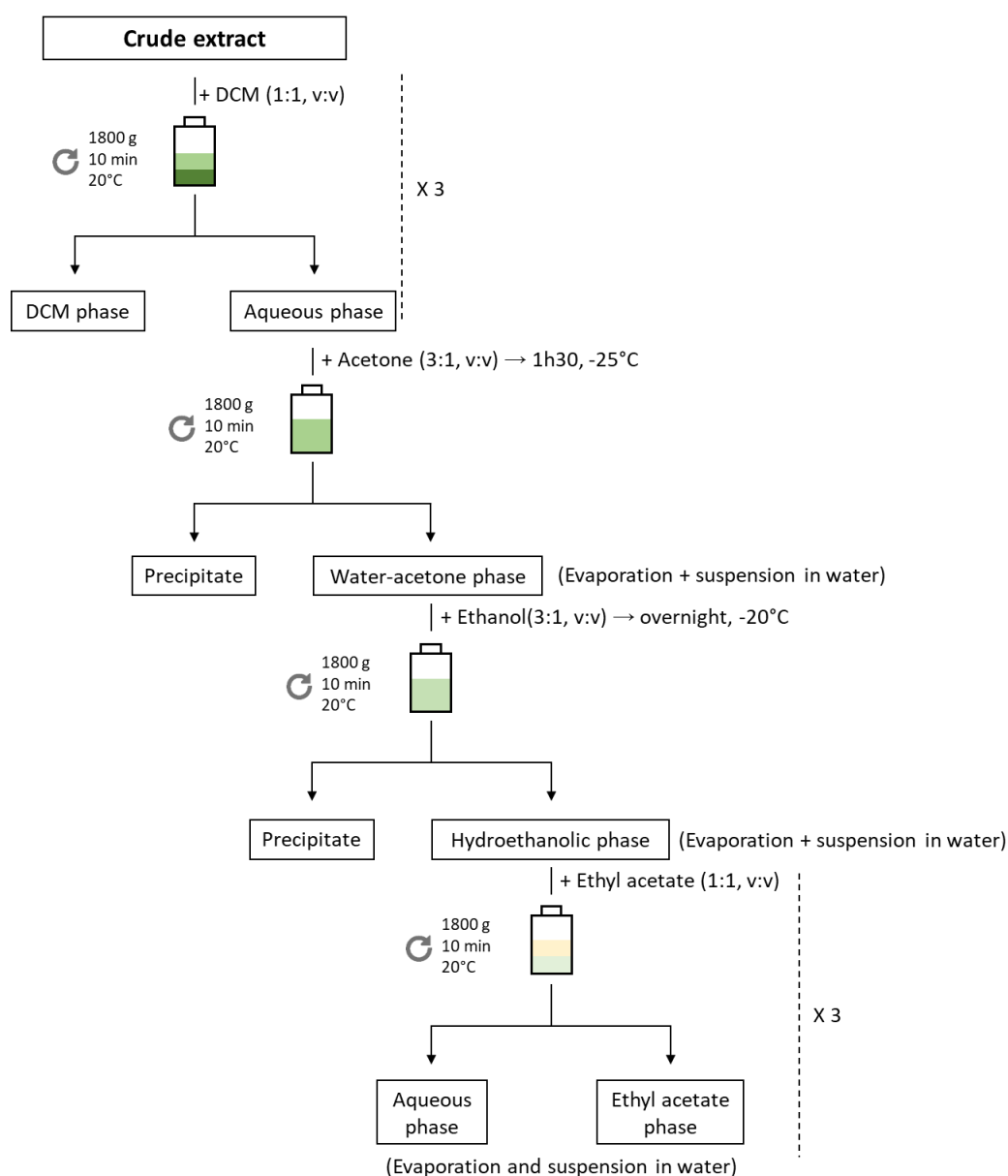
## 1. PREAMBULE

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires de défense produits par les végétaux, connus pour leurs activités antioxydantes, antitumorales, anti-inflammatoires, antifongiques, antibactériennes et antivirales, qui en font des molécules d'intérêt pour des utilisations médicales (Zubia et al. 2009; Onofrejevová et al. 2010; Li et al. 2011; Rajauria et al. 2013; Le Lann et al. 2016). Leur capacité antioxydante a notamment suscité un intérêt dans la recherche médicale, afin de contrer l'impact du stress oxydant sur l'homéostasie du métabolisme osseux (Dai and Mumper 2010; Torre 2017; Zolotareva et al. 2019). Ce métabolisme osseux peut être déséquilibré en faveur de la résorption osseuse par les ostéoclastes entraînant une fragilité osseuse, en raison, par exemple, d'une carence en calcium, d'un âge avancé ou encore de pathologies telles que l'ostéoporose (Chaugule et al. 2017; Bergen et al. 2019; Koshi et al. 2019; Prasad 2021; Zamani et al. 2021). L'ostéoporose découle en partie du stress oxydant car ce stress stimule la différenciation des pré-ostéoclastes et l'activité des métalloprotéinases extracellulaires, tout en induisant l'apoptose des ostéoblastes et des ostéocytes (Banfi et al. 2008; Wauquier et al. 2009; Lepetsos and Papavassiliou 2016; Savasky et al. 2018; Zeng et al. 2020). Ainsi, plusieurs études ont recherché des molécules antioxydantes pouvant contrer le stress oxydant et ainsi permettre la régulation de l'homéostasie osseuse dans le but d'améliorer la régénération tissulaire (Habauzit and Horcajada 2008; Surget et al. 2017; Carson and Clarke 2018; Jiang et al. 2021; Roberto et al. 2021).

Ce chapitre est dédié à l'isolement de composés phénoliques bioactifs issus des végétaux marins suivants : *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cladophora rupestris* et *Plantago lanceolata* par un procédé conventionnel. Les composés ont été extraits par une macération et purifiés par des lavages successifs (technique de purification liquide/liquide) (**Figure III.1**), suivie par une extraction sur phase solide (SPE) (**Figure III.2**). Les teneurs en composés phénoliques ont été mesurées au laboratoire tout au long du procédé de purification. De même, la répartition chimique des composés au sein des échantillons a été analysée sur les extraits/fractions purifiées par résonance magnétique nucléaire du proton ( $^1\text{H}$ -RMN) à la plateforme RMN-RPE de l'UBO. Lorsque les fractions purifiées le permettaient, une analyse RMN en deux dimensions (RMN 2D) a été lancée, permettant la caractérisation structurale des composés. La bioactivité des échantillons a également été analysée au cours de la procédure afin de déterminer l'activité antiradicalaire par le test du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) au laboratoire. L'activité ostéogénique a été évaluée sur les différents échantillons par un partenaire du projet BLUEHUMAN, le Centre des sciences marines (CCMAR) à l'Université d'Algarve (Faro, Portugal) (**Figure III.3**). Une étude préliminaire des activités antibactériennes de certains échantillons a également été menée au laboratoire.

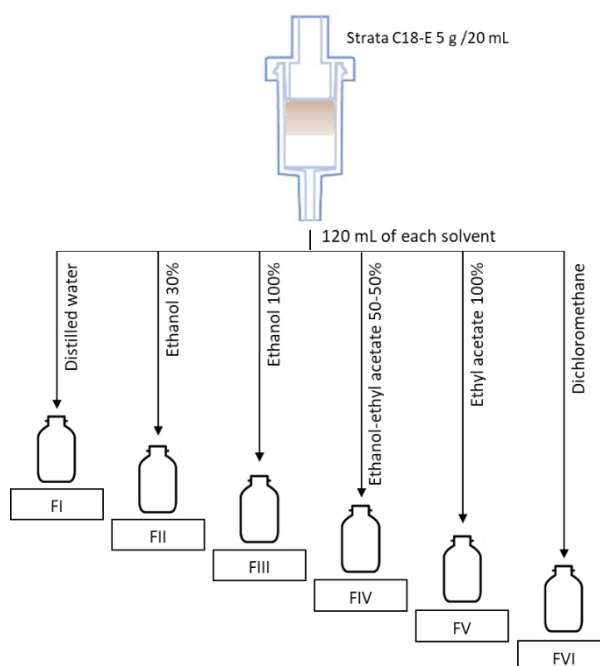
L'objectif principal de ce chapitre est ainsi de générer et caractériser des fractions enrichies en composés phénoliques bioactifs en suivant un protocole conventionnel. Les molécules obtenues seront comparées à celles obtenues selon un procédé éco-respectueux développé dans le cadre de la thèse et dont les résultats sont présentés dans le Chapitre IV.

La stratégie de purification est représentée par la **Figure III.1** et la **Figure III.2**, les protocoles sont détaillés dans la partie « Materials and methods » (page 128) de l'article scientifique. Brièvement, la première étape est une purification liquide/liquide qui consiste à mettre l'extrait brut au contact successif de différents solvants. Le but est de purifier et concentrer les composés phénoliques dans une fraction acétate d'éthyle (EA).



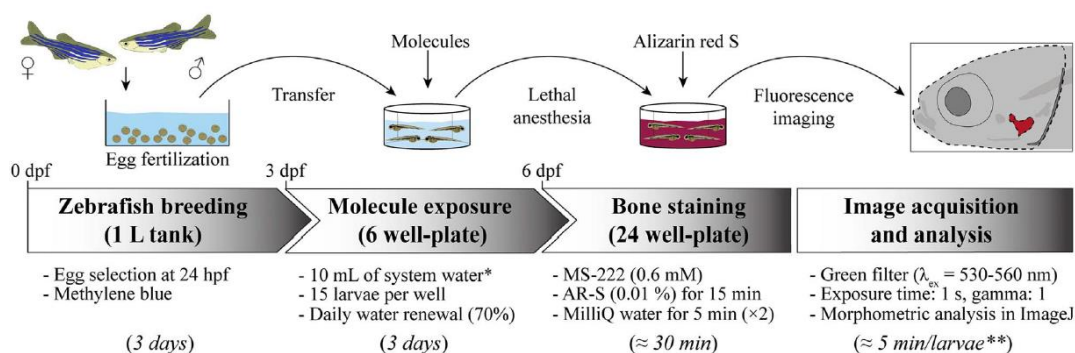
**Figure III.1.** Protocole de la purification liquide/liquide réalisée sur les extraits bruts. Adapté de *Stiger-Pouvreau et al. 2014*.

La deuxième étape est une purification sur une colonne Strata C18-E (Phenomenex, France). La fraction EA est déposée sur la colonne puis différents solvants sont utilisés successivement pour former des fractions de FI à FVI : eau distillée (FI), éthanol:eau distillée (30:70, v/v) (FII), éthanol absolu (FIII), éthanol:acétate d'éthyle (50:50, v/v) (FIV), acétate d'éthyle 100% (FV) et dichlorométhane 100% (FVI). Le but est de purifier et concentrer les composés phénoliques dans différentes fractions, ce qui permet notamment de les caractériser.



**Figure III.2.** Protocole de l'extraction en phase solide (SPE) réalisée sur les fractions acétate d'éthyle.

L'activité ostéogénique des échantillons a été évaluée sur le modèle zebrafish selon le protocole développé par le partenaire CCMAR (**Figure III.3**). Le protocole est détaillé dans la partie « Materials and methods » (page 128) de l'article scientifique.



**Figure III.3.** Etape du processus de criblage des fractions purifiées de végétaux marins, utilisant le système d'opercule du poisson zèbre (modèle zebrafish), développé par le partenaire CCMAR (Faro, Portugal). Source : Tarasco et al. 2017.

## 2. MANUSCRIT DU DEUXIEME ARTICLE SCIENTIFIQUE

### Marine macrophyte extracts enriched in natural bioactive phenolic compounds with antioxidant and osteogenic activities

Manon Buscaglia<sup>1</sup>, Gwenaëlle Le Blay<sup>1</sup>, Marilynne Fauchon<sup>1,2</sup>, Nolwenn Kergosien<sup>1</sup>, Vincent Laizé<sup>3</sup>, Joana T. Rosa<sup>3</sup>, Gaëlle Simon<sup>4</sup>, Stéphane Cérantola<sup>4</sup>, Yannick Toueix<sup>1,2</sup>, Fanny Aulanier<sup>1,2</sup>, Steven Negri<sup>1,2</sup>, Fabienne Guérard<sup>1</sup>, Claire Hellio<sup>1,2</sup> & Valérie Stiger-Pouvreau<sup>1</sup>

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

*(2) Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, Plateforme Biodimar, F-29200 Brest, France*

*(3) Centre of Marine Sciences (CCMAR), University of Algarve, Faro, Portugal*

*(4) Univ Brest, Plateforme RMN-RPE, F-29200 Brest, France*

*Corresponding author at: Université de Brest, Institut Universitaire Européen de la Mer, IUEM/UBO, Laboratoire des sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539 LEMAR, Technopôle Brest Iroise, Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France.*

*E-mail: [claire.hellio@univ-brest.fr](mailto:claire.hellio@univ-brest.fr) (C. Hellio)*

**Keywords:** Marine macrophyte / Osteogenic activity / Phenolic compounds / Solid-phase extraction

## 2.1. Résumé

Le métabolisme du tissu osseux dépend d'un équilibre entre la synthèse et la résorption. Il peut être déséquilibré en faveur de la résorption en raison d'une carence en calcium, d'une alimentation déséquilibrée, d'un âge avancé, de conditions pathologiques, de fractures ou de grands défauts osseux après l'ablation de tissus endommagés. Plusieurs études ont démontré l'effet délétère du stress oxydant sur les os. Ainsi, ce travail porte sur la recherche d'un traitement contre la perte osseuse à base de molécules naturelles dotées de propriétés antioxydantes et d'un potentiel anabolique osseux. Les végétaux marins possèdent une large gamme de composés bioactifs tels que les composés phénoliques (PC). Cette étude porte sur quatre espèces de végétaux marins collectées sur les côtes Nord-Ouest de la France : deux macroalgues, *Bifurcaria bifurcata* et *Cladophora rupestris*, et deux plantes de bord de mer, *Beta vulgaris* subsp. *maritima* et *Plantago lanceolata*. Après une extraction solide/liquide et une semi-purification liquide/liquide, la fraction d'acétate d'éthyle (EA) de chaque espèce a été analysée afin de connaître sa teneur en PC, ainsi que, ses capacités antiradicalaires et ostéogéniques. Les fractions EA de *B. maritima*, *B. bifurcata* et *P. lanceolata* enrichies en PC, ont présenté les plus fortes activités antiradicalaires et ostéogéniques sur les larves de poissons zèbres en augmentant la surface de leur opercule (*B. maritima* : facteur 1,29 à 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ; *B. bifurcata* : facteur 1,32 à 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  et *P. lanceolata* : facteur 1,43 à 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). *C. rupestris* a montré une faible teneur en PC sans bioactivité significative. Le fractionnement par extraction en phase solide (SPE) a permis de caractériser par RMN 2D, la présence de fuhalols et de phloréthols dans la fraction de *B. bifurcata* et de verbascoside comme composé majeur dans la fraction de *P. lanceolata*. Cependant, la séparation par SPE a entraîné la perte d'activité ostéogénique pour toutes les espèces. De plus, une analyse préliminaire de l'activité antibactérienne a montré que la fraction EA et l'une des fractions SPE de *B. bifurcata* pouvaient inhiber la croissance de *Staphylococcus epidermidis* DSM 1798 et *Escherichia coli* DSM 1103. Ces végétaux marins, qui représentent une biomasse élevée, constituent donc une ressource renouvelable qui pourrait fournir des molécules aux applications thérapeutiques dans la perte osseuse.

## 2.2. Abstract

Bone tissue metabolism depends on a balance between synthesis and resorption that can be unbalanced in favor of resorption due to calcium deficiency, unbalanced diet, advanced age, pathological conditions, fractures or large bone defects after damaged tissue removal. Several studies have demonstrated the deleterious effect of the oxidative stress on bones. Thus, in our study, the search for a treatment for bone loss is focused on natural molecules with antioxidant properties and bone anabolic potential. Marine plants contain a wide range of bioactive compounds such as phenolic compounds (PC). This study focuses on four marine species collected on the coasts of NW France: two macroalgae *Bifurcaria bifurcata* and *Cladophora rupestris*, and two green coastal plants *Beta vulgaris* subsp. *maritima* and *Plantago lanceolata*. Following solid/liquid extraction and liquid/liquid semi-purification, the ethyl acetate (EA) fraction of each species was assessed for phenolic contents and for the presence of radical scavenging and osteogenic bioactivities. The *B. maritima*, *B. bifurcata* and *P. lanceolata* EA fractions enriched in PC, exhibited the highest radical scavenging and osteogenic activities on zebrafish larvae by increasing their operculum area (*B. maritima*: 1.29-fold 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; *B. bifurcata*: 1.32-fold 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and *P. lanceolata*: 1.43-fold 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). *C. rupestris* showed low PC content without significant bioactivity. Fractionation by Solid Phase Extraction (SPE) allowed to characterize by 2D NMR, the presence of fuhalols and phloretols in *B. bifurcata* fraction and of verbascoside as major compound in the *P. lanceolata* fraction. However, separation by SPE resulted in loss of osteogenic activity in all species. Moreover, a preliminary study of antibacterial activity showed a potential for the EA fraction and one of the SPE fractions of *B. bifurcata* to inhibit *Staphylococcus epidermidis* DSM 1798 and *Escherichia coli* DSM 1103 growth. These marine plants, which present a high biomass, are therefore a renewable resource that could provide molecules with therapeutic applications in bone loss.

### 2.3. *Introduction*

Bone tissue possesses self-regenerative capacity supported by the activity of the osteoclasts involved in bone catabolism, and the osteoblasts involved in the bone anabolism (Chaugule et al. 2017; Torre 2017; Savasky et al. 2018; Bergen et al. 2019; Koshi et al. 2019). Bone quality depends on the balance between resorption and synthesis processes; a predominance of resorption will lead to bone fragility (Chaugule et al. 2017; Koshi et al. 2019). Factors inducing this imbalance may include calcium deficiency, unbalanced diet, advanced age, pathological conditions such as osteoporosis, fractures or large bone defects after damaged tissue removal (Bergen et al. 2019; Prasad 2021; Zamani et al. 2021). Osteoporosis affects 200 million people worldwide and causes more than 8.9 million fractures per year due to bone fragility (Johnell and Kanis 2006; Al Anouti et al. 2019; Prasad 2021). Osteoporosis is a disease caused notably by oxidative stress that negatively affects bone remodeling by stimulating pre-osteoclast differentiation and extracellular metalloproteinase activity, while inducing apoptosis of osteoblasts and osteocytes (Banfi et al. 2008; Wauquier et al. 2009; Lepetsos and Papavassiliou 2016; Savasky et al. 2018; Zeng et al. 2020). Thus, the use of antioxidant compounds, as scavengers of reactive oxygen species (ROS), would have a beneficial effect on bone formation by stimulating osteoblast differentiation and reducing osteoclast activity (Torre 2017). For several years, biotechnology research has focused on the discovery of new molecules capable of regulating bone homeostasis by improving bone regeneration, in particular, by using the potential of recently discovered marine molecules (Habauzit and Horcajada 2008; Surget et al. 2017; Carson and Clarke 2018; Jiang et al. 2021; Roberto et al. 2021). Among marine organisms, marine plants are rich in valuable bioactive compounds such as hydrocolloids, proteins, pigments, lipids, carbohydrates and other bioactive metabolites, that can bring benefits in sectors such as feed and food, cosmetics, care and health (Hellio et al. 2001a; Plouguerné et al. 2008; Stiger-Pouvreau et al. 2016; Carson and Clarke 2018; Stiger-Pouvreau and Guerard 2018; Cotas et al. 2020; Lalegerie et al. 2020; Gager et al. 2021). Due to their fixed lifestyle, marine plants have adapted by developing defense mechanisms to counteract biotic stresses (e.g. grazing, fouling and pathogen infection) and abiotic stresses (e.g. UV radiation and oxidative stress) (Connan et al. 2004; Onofrejevá et al. 2010; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Lalegerie et al. 2020). Phenolic compounds (PC) are defense molecules constituting a large family of aromatic moiety. Their structure is characterized by phenol core with hydroxyl groups and various linkages leading to a variety of simple and complex chemical structures (Grassmann et al. 2002; Audibert et al. 2010; Dai and Mumper 2010; Abu Khalaf et al. 2019). They are known for their broad spectrum of bioactivities with applications for human health such as antioxidant, antitumor, anti-inflammatory, antifungal, antibacterial and antiviral activities (Zubia et al. 2009; Onofrejevá et al. 2010; Li et al. 2011; Rajauria et al. 2013; Le Lann et al. 2016; Gager et al. 2021). They also exhibit

osteogenic activities through mechanisms that still need to be better explored but could involve a stimulation of the alkaline phosphatase (ALP) activity, increasing mineralization by inhibiting extracellular pyrophosphate, and an increase in the expression of type I collagen, bone sialoprotein and osteopontin (Koshi et al. 2019; Oh et al. 2019; Vimalraj 2020). PC are therefore promising candidates for next generation pharmaceuticals to improve bone mineral density (Habauzit and Horcajada 2008; Córdoba et al. 2015; Surget et al. 2017; Roberto et al. 2021). Moreover, PC are known for their antibacterial properties, which could be an advantage when combined with bone implants to limit potential bone infection in addition to their osteogenic activity (Chihara and Segreti 2010; Birt et al. 2017; Mieszkowska et al. 2020; Platania et al. 2021).

In this study, the potential of PC in extracts and fractions from four marine macrophytes was assessed: the macroalgae *Bifurcaria bifurcata* R.Ross (Phaeophyceae, Sargassaceae) and *Cladophora rupestris* (L.) Kützinger (Ulvophyceae, Cladophoraceae), and the green coastal plants *Beta vulgaris* subsp. *maritima* (L.) Arcang. (Magnoliopsida, Amaranthaceae), also known as *Beta maritima*, and *Plantago lanceolata* (L.) (Magnoliopsida, Plantaginaceae). *B. bifurcata* is already known for its richness in bioactive PC (such as fuhals) with antioxidant, antifouling, antitumoural and antimicrobial activities (Maréchal et al. 2004; Zubia et al. 2009; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Alves et al. 2016; Agregán et al. 2018). *C. rupestris* PC-enriched fractions displays a broad range of bioactivities, such as antibacterial, antioxidant, antidiabetic, antiparasitic activities, as well as, osteogenic and pro-mineralogenic properties (Surget et al. 2017; Munir et al. 2019). *B. maritima* is traditionally used since prehistory as a medicinal plant to treat digestive disorders, anemia, burning and pain in the throat thanks to their antioxidant PC (Biancardi et al. 2012; Morales et al. 2014). In the same way, *P. lanceolata* is used in traditional medicine for its antibacterial (Gram-negative and Gram-positive bacteria), anti-inflammatory or wound-healing properties associated with its flavonoids such as apigenin, luteolin, baicalein or nepetin (Beara et al. 2009; Radu et al. 2010; Alemu and Andualem 2014; Gonçalves and Romano 2016).

The objective of this study was to identify bioactive PC with osteogenic and/or antibacterial properties by screening these marine macrophytes. PC will be purified using conventional procedure, by solid/liquid extraction, liquid/liquid semi-purification and finally solid-phase extraction (SPE). The presence of PC will be monitored by Folin-Ciocalteu assay (aromatic compounds quantification) and proton nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ). Economically valuable activities for food, cosmetic, and especially medical applications will be assessed in each extract and fraction through radical scavenging activity assessed by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, and preliminary data that were obtained by an EUCAST broth microdilution method for the antibacterial activity.



## 2.4. *Materials and methods*

### 2.4.1. *Material origins*

#### Biological material sampling

Raw materials were harvested on the NW France, Atlantic coasts (Brittany). *Bifurcaria bifurcata* and *Plantago lanceolata* were collected in October 2018 at the Pointe du Diable (48°21'14.7"N, 4°33'32.2"W, Plouzané, Brittany, France), and *Beta maritima* and *Cladophora rupestris* were collected in October 2019 at Porsmeur creek (48°28'58.1"N, 4°46'11.6"W, Porspoder, Brittany, France). The specimens were hand-harvested using scissors to collect the biomass, in order to minimize the impact on regrowth. After collection, samples were washed with tap water to remove residual salts, epiphytes and epifauna, and cut into 2-3 cm pieces. After freezing at -20°C, they were freeze-dried (Alpha 1-4 LD, Christ, France) and ground to a fine powder using a planetary ball mill (PM 400, Retsch, France).

#### Chemical materials

All used chemicals and reagents were analytical grade. The organic solvents, acetone, ethanol, ethyl acetate, and dichloromethane (DCM) were purchased from Carlo Erba Reagents (Italy). Ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, butylated hydroxyanisol (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), gallic acid, phloroglucinol, and 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) were purchased from Sigma-Aldrich (France). Folin-Ciocalteu's reagent was purchased from VWR (France). Sodium carbonate was purchased from Grosseron (France). NMR solvents like deuterium oxide (D<sub>2</sub>O) and methanol-d<sub>4</sub> (MeOD) were purchased from Eurisotop (Germany).

### 2.4.2. *Extraction and purification of phenolic compounds*

#### Solid/liquid extraction

Crude extracts (CE) were produced by solid/liquid extraction (Le Lann et al. 2008; Surget et al. 2015). Briefly, 15 g of macrophyte powder were extracted in duplicate with 150 mL of ethanol:distilled water (1:1, v/v) for 2 h at 40°C in the dark under orbital stirring at 200 rpm (Julabo GmbH SW22, Germany). The mixtures were centrifuged at 3220 g for 5 min (Eppendorf Centrifuge 5810R, Germany) to recover the supernatants, which were filtered with grade GF/D and GF/F Whatman filters. The residual powders were extracted twice more, using the same procedure for each duplicate with 1-hour incubation steps. Supernatants collected for both duplicates were pooled (900 mL in total), solvents were evaporated (Rotavapor RII, BUCHI, France) and final volume was adjusted to 110 mL with distilled water. A volume of 10 mL was kept and freeze-dried for further biochemical and NMR analyses, and

the remaining 100 mL were further purified. This extraction was carried out in triplicate to obtain three CE for each species.

#### Liquid/liquid semi-purification

CE were fractionated by liquid/liquid semi-purification. The procedure consists in removing lipid compounds and chlorophyll pigments by washings with DCM, and proteins and carbohydrates by precipitations with ethanol and acetone (Stiger-Pouvreau et al. 2014; Ar Gall et al. 2015; Jégou et al. 2021). For the first step, the CE (100 mL) was mixed with dichloromethane in a 1:1 (v/v) ratio. After a 10-min centrifugation at 1800 g at 20°C, the aqueous upper phase was recovered and the dichloromethane phase was preserved for biochemical analyses. This purification step was repeated twice more on the aqueous upper phase. The volume of the aqueous phase was reduced by evaporation (Rotavapor RII, BUCHI, France) and final volume was adjusted to 50 mL with distilled water. The first precipitation step was then carried out by adding acetone (150 mL); the mixture was vigorously shaken and placed for 1h30 at -25°C. After a 10-min centrifugation at 1800 g at 20°C, the supernatant was partially evaporated and adjusted to 50 mL with distilled water. The second precipitation step was carried out with ethanol following the same procedure. The recovered supernatant was adjusted to 100 mL with distilled water. The last step was achieved by adding ethyl acetate in a 1:1 (v/v) ratio. The mixture was homogenized and centrifuged 10 min at 1800 g at 20°C. The upper ethyl acetate phase was collected and the aqueous lower phase was washed twice more following the same procedure. At the end, two fractions were recovered, a fraction with the ethyl acetate supernatants (EA fraction) and an aqueous fraction (AQ fraction). Both fractions were evaporated, freeze-dried and stored at -20°C.

#### Purification by Solid Phase Extraction (SPE)

The final fractionation of compounds was carried out by Solid Phase Extraction (SPE) with a SPE device (Vac Elut SPS 24, Agilent Technologies, United-States) (Zubia et al. 2009). The EA fraction (50 mg) solubilized in distilled water (5 mL) was charged on a SPE cartridge (Strata C18-E 5 g/20 mL, Phenomenex, France), previously, activated with absolute ethanol (120 mL) and conditioned with distilled water (120 mL). The separation was performed by a decreasing polarity elution with 120 mL of each following solvents: distilled water (FI), ethanol:distilled water (30:70, v/v) (FII), absolute ethanol (FIII), ethanol:ethyl acetate (50:50, v/v) (FIV), 100% ethyl acetate (FV) and 100% dichloromethane (FVI). All fractions were recovered, evaporated and freeze-dried before storage at -20°C.

The mass yields of extraction and purification were determined by the ratio between the obtained mass of extract or fraction and the mass of raw material used (dry basis). The results are presented by mean  $\pm$  standard deviation.

#### 2.4.3. Determination of biological activities

##### Radical scavenging test

The radical scavenging activities were measured by the DPPH assay (Le Lann et al. 2016). Experiments were performed in 96-well microplates (Greiner Bio One, France), 22  $\mu$ L of sample or standards were added to 200  $\mu$ L of daily prepared DPPH solution (25 mg.L<sup>-1</sup>). After 1-hour incubation in the dark at room temperature, the absorbance was read at 540 nm (Infinite M200, TECAN, France). Negative controls consisted of distilled water and absolute ethanol, and positive controls were ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, BHT and BHA (each with concentrations ranging from 0.01 to 0.5 g.L<sup>-1</sup>). The radical scavenging activity was expressed as the inhibition concentration, which represents the sample concentration required to obtain a 50% inhibition of the radical DPPH (IC<sub>50</sub> in g.L<sup>-1</sup>). IC<sub>50</sub> values were estimated by a linear regression analysis, a low IC<sub>50</sub> value corresponding to a high radical scavenging activity. This analysis was carried out in triplicate for each sample.

##### Osteogenic Activity

Broodstock of adult zebrafish (AB wild-type strain; ZFIN ID: ZDB-GENO-960809-7) were maintained at the zebrafish facility of the Centre of Marine Sciences (CCMAR, Portugal) in a ZebTEC recirculating system (Tecniplast, Italy) under the following conditions: temperature  $28 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , pH  $7.5 \pm 0.1$ , conductivity  $700 \pm 50 \mu\text{S}$  and a 14|10h light|dark photoperiod. Conductivity and pH were stabilized using Instant Ocean salt mixture (Aquarium Systems) and sodium bicarbonate (Fisher Chemicals), respectively, dissolved in reverse osmosis treated water. Nitrogen compounds were monitored weekly and maintained within the following limits: lower than 0.1 mg.L<sup>-1</sup> for ammonia and nitrites, and lower than 5 mg.L<sup>-1</sup> for nitrates. Sexually mature zebrafish were crossed following an in-house breeding program and fertilized eggs were transferred into a 1L container with static water conditions with the same parameters described above. Methylene blue (0.0002% w/v) was added to prevent fungal growth. In order to evaluate the osteogenic potential of fractions on bone growth, zebrafish larvae at 3 days post-fertilization (dpf) were exposed to EA fractions (10 or 100  $\mu\text{g.m L}^{-1}$ ), FII (1, 10 or 100  $\mu\text{g.m L}^{-1}$ ), calcitriol (1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>; Sigma-Aldrich) (10 pg.mL<sup>-1</sup>), 0.1% DMSO (vehicle for EA fractions) or 0.1% ethanol (vehicle for FII and calcitriol), in a 12-well plate (10 fish/well in 4 mL of fish water) and placed in the dark (to avoid photodegradation of the compounds) at 28.5°C. Treatments were renewed (70% of the total volume) daily until the end of the treatment. At 6 dpf, and

following a protocol previously described by [Tarasco et al. 2017](#), larvae were live-stained for 15 min at room temperature with 0.01% alizarin red S (AR-S), prepared in fish water (pH 7.4), washed twice with fish water for 5 min and sacrificed with a lethal dose of tricaine (MS-222; Sigma-Aldrich) prior imaging. Stained larvae were then imaged and analyzed morphometrically using ImageJ 1.50e software and a toolset for semi-automatic analysis of zebrafish operculum as previously described in [Tarasco et al. 2020](#).

#### 2.4.4. Quantity and structural elucidation

##### Total phenolic content

Total phenolic contents were determined by the Folin-Ciocalteu assay, as follows [Zubia et al. 2009](#). In a 96-well microplate (Greiner Bio One, France), 20  $\mu\text{L}$  of sample or standard were mixed with 130  $\mu\text{L}$  of distilled water, 10  $\mu\text{L}$  of Folin-Ciocalteu reagent and 40  $\mu\text{L}$  of sodium carbonate ( $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). After a 10-minute incubation in the dark at  $70^\circ\text{C}$ , the reaction was stopped by cooling the plate for 10 min on ice. The final absorbance was measured at 620 nm (Infinite M200, TECAN, France). The total phenolic content was then expressed in milligram per gram of dry sample ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  DW) in comparison with standard curves of phloroglucinol (for brown macroalgae) and gallic acid (for green lineage). This analysis was carried out in triplicate for each tested sample.

##### Structural elucidation by Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

Proton nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$ -NMR) analyses were performed using a Bruker Avance III HD 500 MHz NMR spectrometer (Bruker, France). Each sample (5 mg) was solubilized in deuterated solvents (700  $\mu\text{L}$ ) ( $\text{D}_2\text{O}$  for CE, AQ fractions and FI, and MeOD for EA fractions, FII and FIII) to obtain its  $^1\text{H}$ -NMR spectra. Spectra were analyzed with the MestReNova software (v6.0.2-5475). They represented the chemical shifts of protons (in ppm) to determine chemical groups present in the sample.

Heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) experiments provided the chemical shifts of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  (in ppm) using the Bruker Avance 500 system (Bruker, France) to determine the PC nature. The different signals on the HMBC analysis were interpreted according to [Cérantola et al. 2006](#) and [Vissers et al. 2017](#).

#### 2.4.5. Statistical analyses

Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least three replicates. The statistical analyses were performed with the R software (v.3.6.1) and the integrated environment

RStudio (v.1.2.1335). The significance of differences between groups was tested by One-way Analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's or Dunnett's multiple comparison tests ( $p < 0.05$ ), respectively for PC content and radical scavenging activity, and for osteogenic activity. All data were checked for normality (Shapiro–Wilk's test) and homoscedasticity (Bartlett's test) ( $p < 0.05$ ). In the case where data were not normally distributed or not homogenous for variances, ANOVA was still performed as it remains robust to low heteroscedasticity and low skewness or kurtosis of the data distributions, as mentioned in Underwood et al. 1997. All graphs produced were performed using the software Excel 2016.

## 2.5. Results

### 2.5.1. Crude extract (CE) and liquid/liquid semi-purified fractions

Extraction mass yields

The extraction mass yields ranged from  $31.2 \pm 8.7\%$  for *Cladophora rupestris* CE to  $50.4 \pm 6.6\%$  for *Plantago lanceolata* CE (Table III.1). After the liquid/liquid procedure, the AQ fractions displayed the highest masses, with yields above 40% for all four species. The EA fractions showed lower mass yields with  $0.7 \pm 0.3\%$  for *Bifurcaria bifurcata*,  $0.9 \pm 0.2\%$  for *Beta maritima*,  $0.9 \pm 1.1\%$  for *P. lanceolata* and  $1.3 \pm 0.4\%$  for *C. rupestris*.

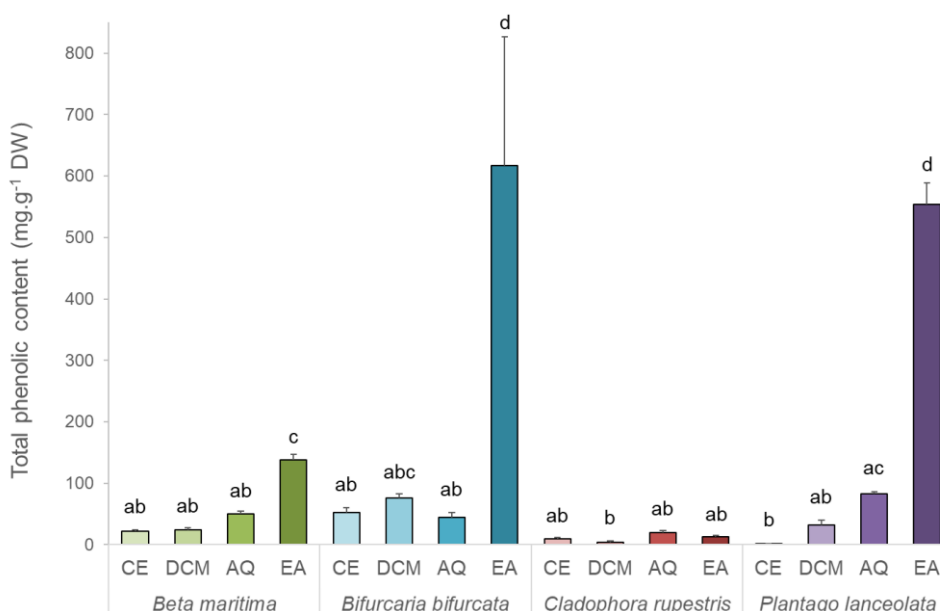
**Table III.1.** Mass yields (%) after extraction (crude extract – CE) and liquid/liquid semi-purification (ethyl acetate fraction – EA, and aqueous fraction – AQ) from the macrophytes *Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cladophora rupestris* and *Plantago lanceolata*. Values are means  $\pm$  SD (n values are provided for each sample).

Species	Extract/fraction	Mass yield (%)
<i>Beta maritima</i>	CE (n=10)	$41.2 \pm 1.9$
	AQ (n=4)	$42.1 \pm 5.8$
	EA (n=4)	$0.9 \pm 0.2$
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	CE (n=8)	$47.2 \pm 2.9$
	AQ (n=3)	$49.2 \pm 5.1$
	EA (n=3)	$0.7 \pm 0.3$
<i>Cladophora rupestris</i>	CE (n=6)	$31.2 \pm 8.7$
	AQ (n=3)	$42.7 \pm 1.7$
	EA (n=3)	$1.3 \pm 0.4$
<i>Plantago lanceolata</i>	CE (n=4)	$50.4 \pm 6.6$
	AQ (n=2)	$63.2 \pm 2.1$
	EA (n=2)	$0.9 \pm 1.1$

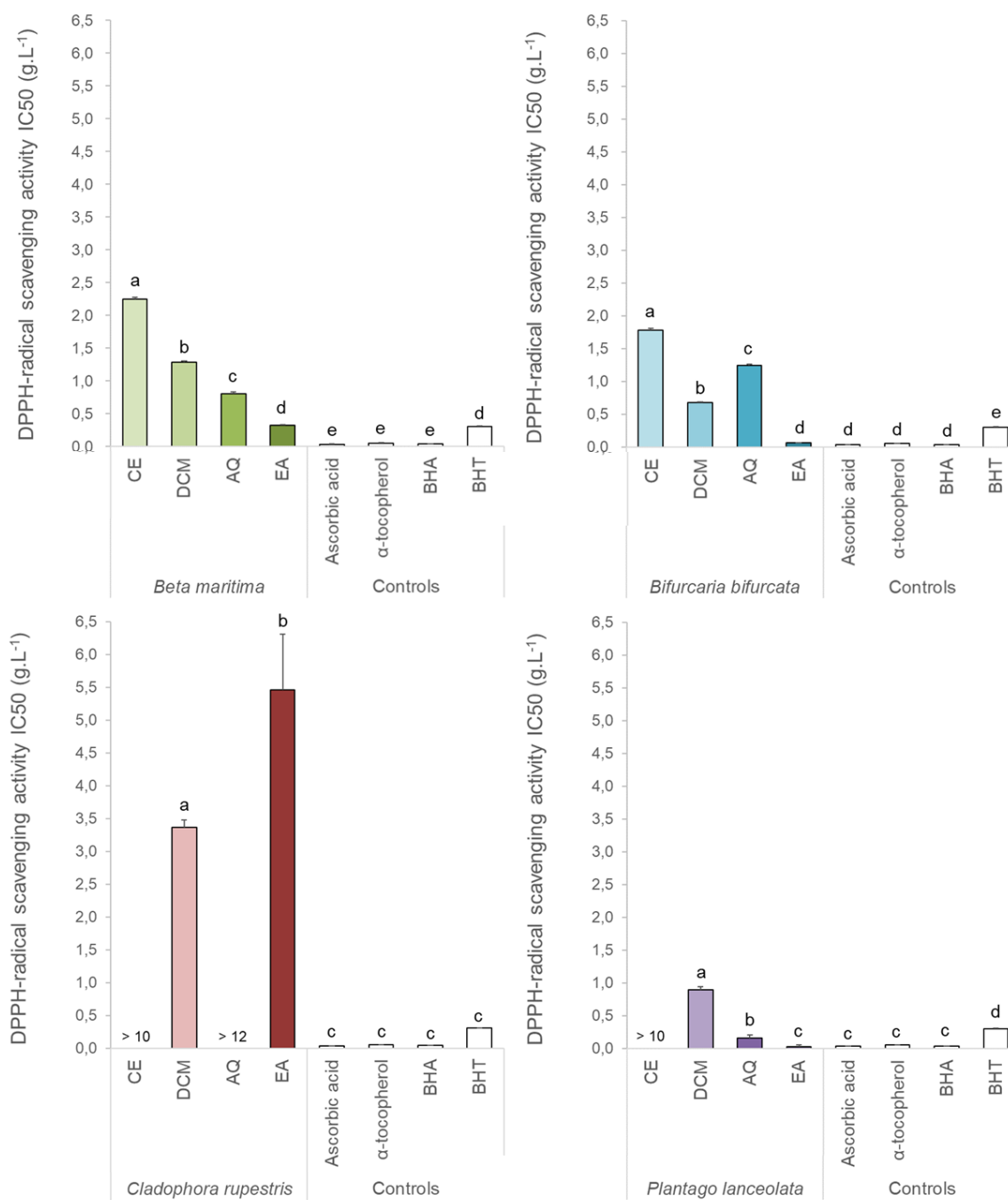
## PC quantification and radical scavenging activity

The total PC contents of the CE varied according to the species (**Figure III.4**). The *B. bifurcata* CE presented the highest PC content ( $52.26 \pm 8.45 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ), followed in decreasing order by *B. maritima* ( $21.95 \pm 1.90 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ), *C. rupestris* ( $9.90 \pm 1.82 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) and *P. lanceolata*, which displayed the lowest PC content ( $1.11 \pm 0.55 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ). The liquid/liquid procedure resulted in a significant PC enrichment in the EA fractions of *B. maritima*, *B. bifurcata* and especially *P. lanceolata*, with 6.3-fold, 11.8-fold and 500.7-fold more PC, respectively, than in their CE (**Figure III.4**). The EA fractions of *B. bifurcata* and *P. lanceolata* were the richest with PC representing  $61.7 \pm 21.0\%$  and  $55.4 \pm 3.5\%$  of the fraction mass. In contrast, the AQ fractions of *B. maritima*, *B. bifurcata* and *C. rupestris* showed a significantly lower PC concentration than their EA fraction but were comparable with their CE. In the contrary, *P. lanceolata* showed a PC-enrichment in its AQ fraction (74.6-fold the CE), however, it was significantly lower than the enrichment in its EA fraction. The DCM purification step resulted in low PC loss for all investigated species.

The radical scavenging activities were determined through IC<sub>50</sub> values (**Figure III.5**). The four CE were significantly less active than the four positive controls. The *B. maritima* EA fraction was as active as BHT with an IC<sub>50</sub> value of  $0.33 \pm 0.01 \text{ g.L}^{-1}$ , whereas the *B. bifurcata* and *P. lanceolata* EA fractions were as active as the three most active controls (ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol and BHA) with respective IC<sub>50</sub> values of  $0.06 \pm 0.0006 \text{ g.L}^{-1}$  and  $0.03 \pm 0.03 \text{ g.L}^{-1}$ . The three IC<sub>50</sub> values from *C. rupestris* CE and AQ fraction, and *P. lanceolata* CE exceeded  $10 \text{ g.L}^{-1}$  and could not be precisely determined.



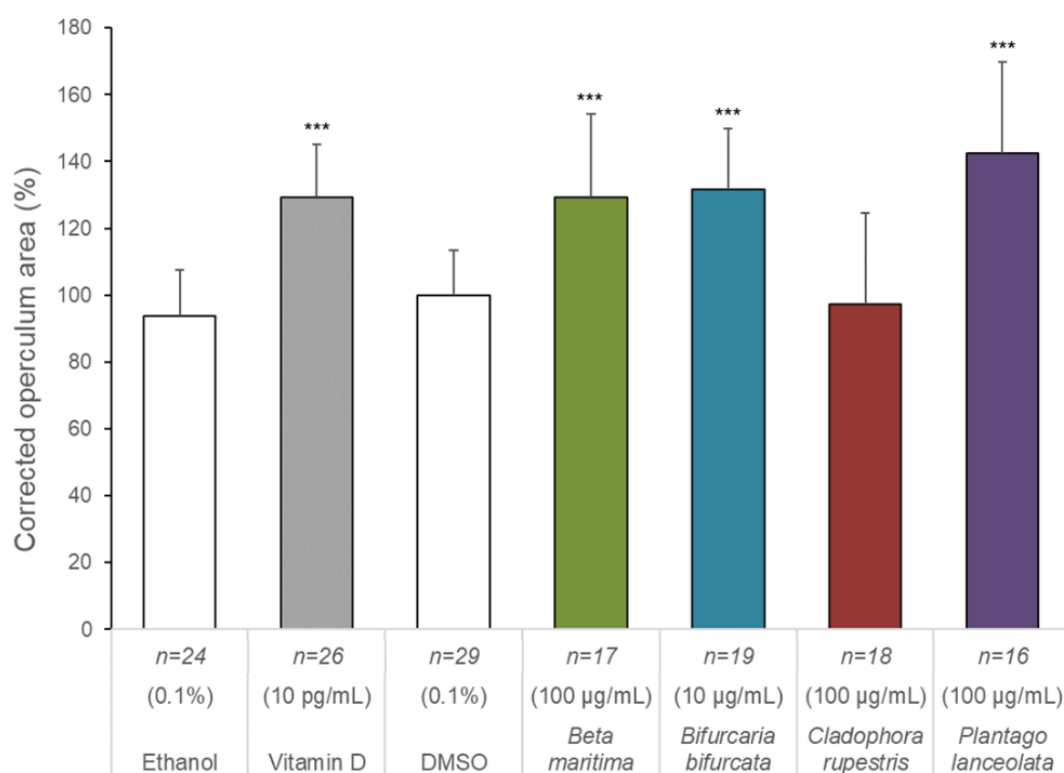
**Figure III.4.** Total phenolic contents of crude extracts (CE), dichloromethane fractions (DCM), aqueous fractions (AQ) and ethyl acetate fractions (EA) from the macrophytes *Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cladophora rupestris* and *Plantago lanceolata*. Values are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Different letters indicate significant differences between samples in total phenolic content (One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test;  $p < 0.05$ )



**Figure III.5.** Radical scavenging activity (DPPH, IC<sub>50</sub>) of crude extracts (CE), dichloromethane fractions (DCM), aqueous fractions (AQ) and ethyl acetate fractions (EA) from the macrophytes *Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cladophora rupestris* and *Plantago lanceolata*. Values are means ± SD (n = 3). Different letters indicate significant differences in radical scavenging activity (One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test; p < 0.05). BHA: Butylated hydroxyanisole. BHT: Butylated hydroxytoluene

## Osteogenic activity

The osteogenic activities were tested by exposing zebrafish larvae to the four PC-enriched and active EA fractions (**Figure III.6**). The *B. maritima* and *P. lanceolata* fractions displayed osteogenic activity at  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  by increasing the mineralized operculum area by, respectively, 1.29-fold and 1.43-fold over the negative control (DMSO). The *B. bifurcata* EA fraction also demonstrated osteogenic activity with an increase by 1.32-fold over the negative control. This fraction was tested at  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  only because of its lethality on zebrafish larvae at  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (*data not shown*). The three EA fractions (*B. maritima*, *B. bifurcata* and *P. lanceolata*) increased the zebrafish operculum area to levels similar to the positive control (vitamin D), however, the tested fraction concentrations were higher. The *C. rupestris* EA fraction did not show any osteogenic activity on the zebrafish larvae at the tested concentration.



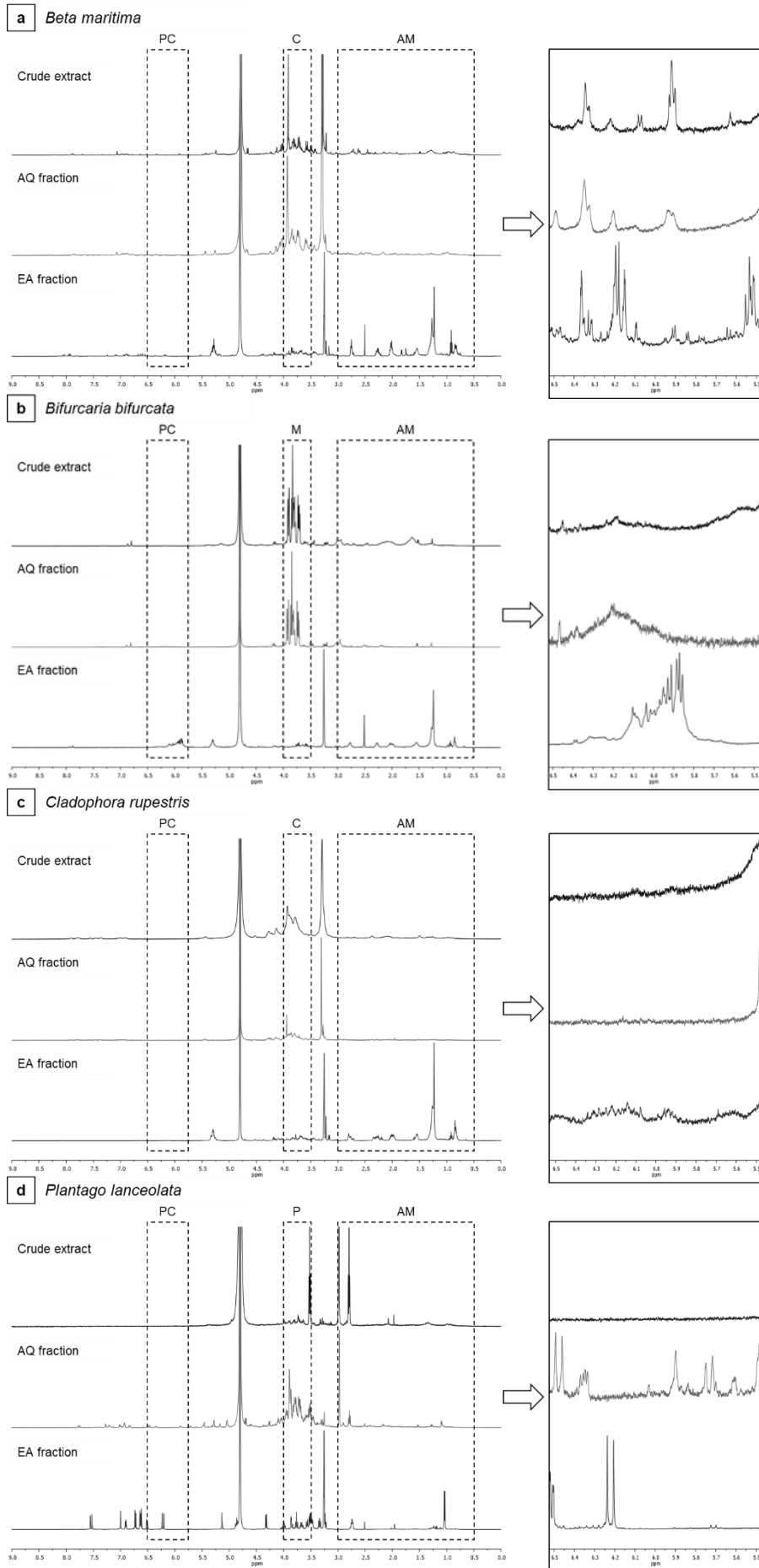
**Figure III.6.** Effect of ethyl acetate fraction (EA) from the macrophytes *Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cladophora rupestris* and *Plantago lanceolata* on the mineralization of zebrafish operculum area (% over negative control). Negative controls: Ethanol and Dimethyl sulfoxide (DMSO). Positive control: Vitamin D. Values are means  $\pm$  SD (n values are provided for each sample). \* indicate values significantly different from the control values (One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



<sup>1</sup>H-NMR characterization

<sup>1</sup>H-NMR analyses were performed to identify the composition of CE, AQ and EA fractions from the four species (**Figure III.7**). The deuterated solvents were characterized by a peak at 4.79 ppm for the D<sub>2</sub>O and two peaks at 3.31 and 4.79 ppm for the MeOD.

The three spectra of *B. maritima* presented signals between 3.5-4 ppm, corresponding to the carbohydrate region (**Figure III.7a**). Both CE and AQ spectra showed reduced signals from the other molecular groups compared to carbohydrate. The EA fraction displayed peaks mainly present in the apolar molecules region (0.5-3.0 ppm) and low intensity peaks in the aromatic region (5.7-6.5 ppm). Stretching this spectra in the aromatic area showed more well defined peaks indicating a higher complexity of molecules. The *B. bifurcata* CE and AQ <sup>1</sup>H-NMR spectra were predominantly dominated by strong signals in the carbohydrate region, matching with the mannitol profile (**Figure III.7b**). The effect of the liquid/liquid procedure was visible in the EA fraction where the mannitol signal was strongly reduced to reveal peaks in the apolar molecules region, as well as in the aromatic region. These peaks were clustered and more defined than in the other two spectra (CE and AQ fraction). The *C. rupestris* spectra of CE and AQ fractions were similar with peaks predominantly present in the carbohydrate region between 3.5-4.0 ppm and low intensity peaks in the zone of aromatic compounds and the zone of apolar compounds (**Figure III.7c**). In contrast, the EA fraction had many peaks in the apolar compounds region, and lower intensity peaks in the carbohydrate and PC regions. By stretching the aromatic compound area, it was visible that the EA fraction had the highest peak complexity. The *P. lanceolata* CE spectrum did not show any peaks in the aromatic area, however, high intensity signals were recorded in the carbohydrates and the apolar compounds areas (**Figure III.7d**). In contrast, the spectra of the AQ and EA fractions revealed peaks in the aromatic region. The large number of peaks present in the AQ fraction reflects a greater diversity of PC in this fraction than in the EA fraction, however the latter contained better defined peaks. The AQ fraction was rich in carbohydrates according to the signal intensity in this region. Carbohydrates and apolar compounds were also present in the EA fraction but their intensity no longer overwhelmed the signals of the aromatic compounds. These spectra confirmed the PC content obtained by the colorimetric assay. Indeed, the PC signals (5.7-6.5 ppm) of the EA fractions seemed to be more abundant and signals were more defined than in other spectra for *B. maritima*, *B. bifurcata* and *P. lanceolata*. However, the compounds characterization was not possible at this purification stage, so in the four investigated species, a second fractionation by SPE was pursued on the EA fractions.



**Figure III.7.**  $^1\text{H-NMR}$  spectra of *Beta maritima* (a), *Bifurcaria bifurcata* (b), *Cladophora rupestris* (c) and *Plantago lanceolata* (d) crude extracts, ethyl acetate fractions (EA) and aqueous fractions (AQ) with focus on their aromatic compound area. PC: Phenolic compounds, C: carbohydrates, M: mannitol, and AM: apolar molecules

### 2.5.2. SPE purified fractions

#### Purification mass yields

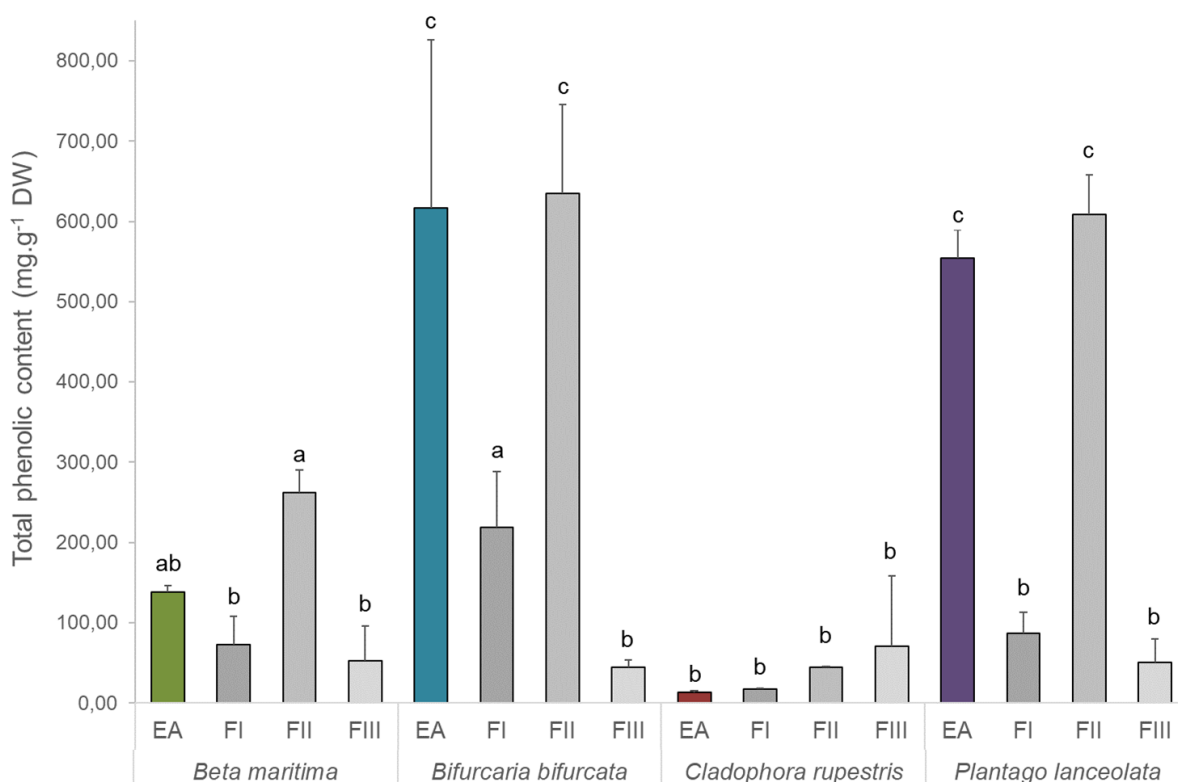
In order to further concentrate the PC and to characterize them, all EA fractions were purified by SPE and six fractions were generated for each. Only three fractions (FI, FII and FIII) had sufficient mass to allow their analysis (**Table III.2**). The brown macroalga *B. bifurcata* displayed the highest mass yield with  $60.8 \pm 23.5\%$  in FI, then it decreased in the following fractions. For the two halophytes, *B. maritima* and *P. lanceolata*, the mass yields were higher in FII with  $39.6 \pm 8.5\%$  and  $93.2 \pm 3.0\%$ , respectively. *C. rupestris* showed its highest mass yield with  $54.9\%$  in FIII.

**Table III.2.** Mass yields (%) after the SPE purification (FI: H<sub>2</sub>O fraction, FII: 30% ethanol fraction, and FIII: 100% ethanol fraction) of the ethyl acetate (EA) fractions from the macrophytes *Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cladophora rupestris* and *Plantago lanceolata*. Values are means  $\pm$  SD (n values are provided for each sample).

Species	Fraction	Mass yield (%)
<i>Beta maritima</i>	FI (n=2)	$20.6 \pm 4.6$
	FII (n=2)	$39.6 \pm 8.5$
	FIII (n=2)	$35.7 \pm 5.2$
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	FI (n=2)	$60.8 \pm 23.5$
	FII (n=2)	$34.5 \pm 2.4$
	FIII (n=2)	$16.7 \pm 8.9$
<i>Cladophora rupestris</i>	FI (n=1)	26.9
	FII (n=1)	3.8
	FIII (n=1)	54.9
<i>Plantago lanceolata</i>	FI (n=3)	$5.6 \pm 1.1$
	FII (n=3)	$93.2 \pm 3.0$
	FIII (n=3)	$5.3 \pm 1.1$

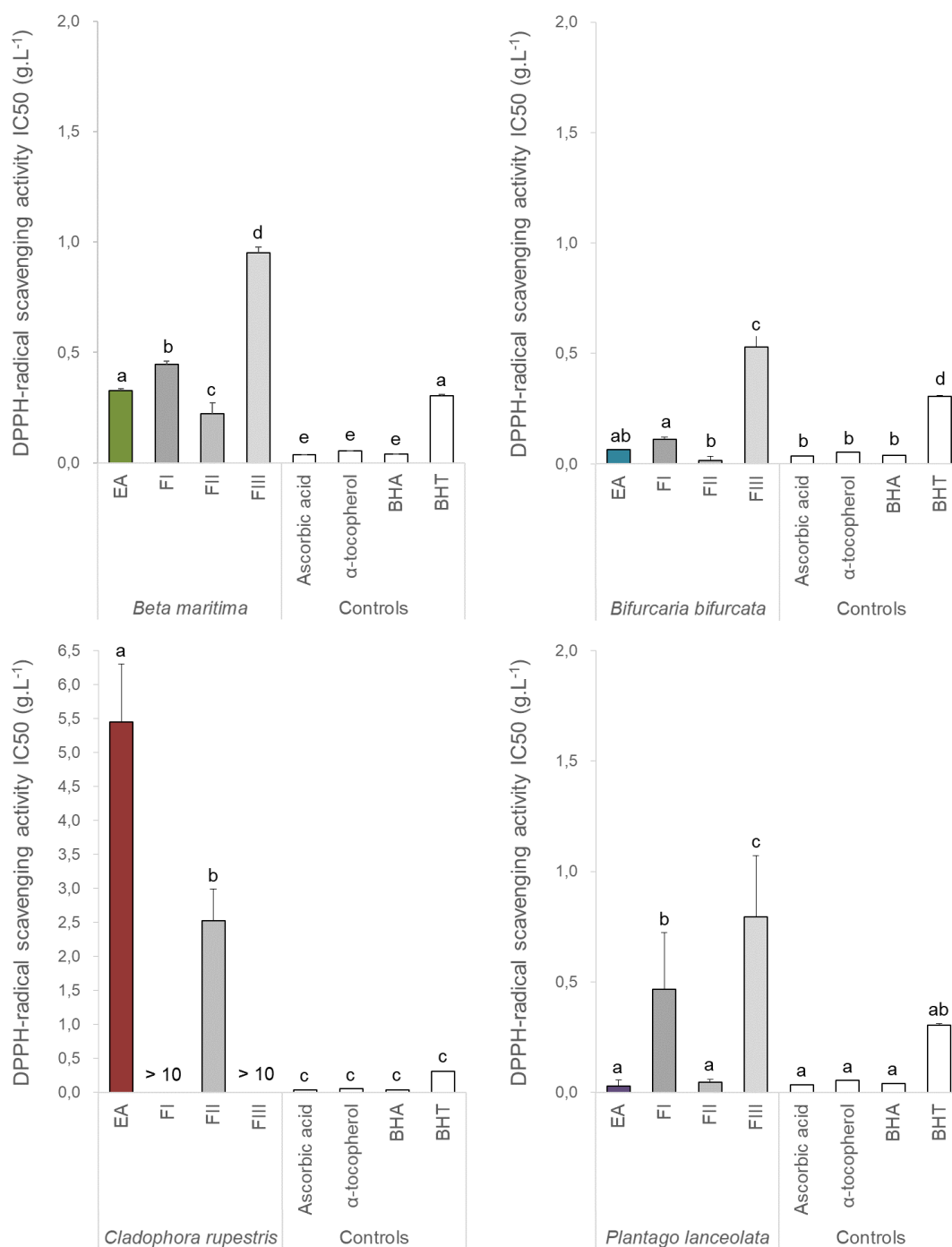
#### PC quantification and radical scavenging activity

Purification by SPE did not significantly PC-enrich the fractions whatever the species (**Figure III.8**). For *B. maritima*, *B. bifurcata* and *P. lanceolata*, FII was the most PC-enriched of the purified fractions with  $261.78 \pm 28.94$ ,  $634.59 \pm 110.88$  and  $608.82 \pm 48.90$  mg.g<sup>-1</sup> DW, respectively. For *C. rupestris*, FIII was the most enriched fraction with  $70.94 \pm 87.33$  mg.g<sup>-1</sup> DW. The three species of the green lineage showed the highest PC contents in the fractions with the highest mass yields. The most PC-rich fractions were FII of *B. bifurcata* and *P. lanceolata* with a slight enrichment compared to their EA fraction.



**Figure III.8.** Total phenolic contents of ethyl acetate fractions (EA) and the SPE fractions (FI: H<sub>2</sub>O fraction, FII: 30% ethanol fraction, and FIII: 100% ethanol fraction) from the macrophytes *Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cladophora rupestris* and *Plantago lanceolata*. Values are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Different letters indicate significant differences between samples in total phenolic content (One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test;  $p < 0.05$ )

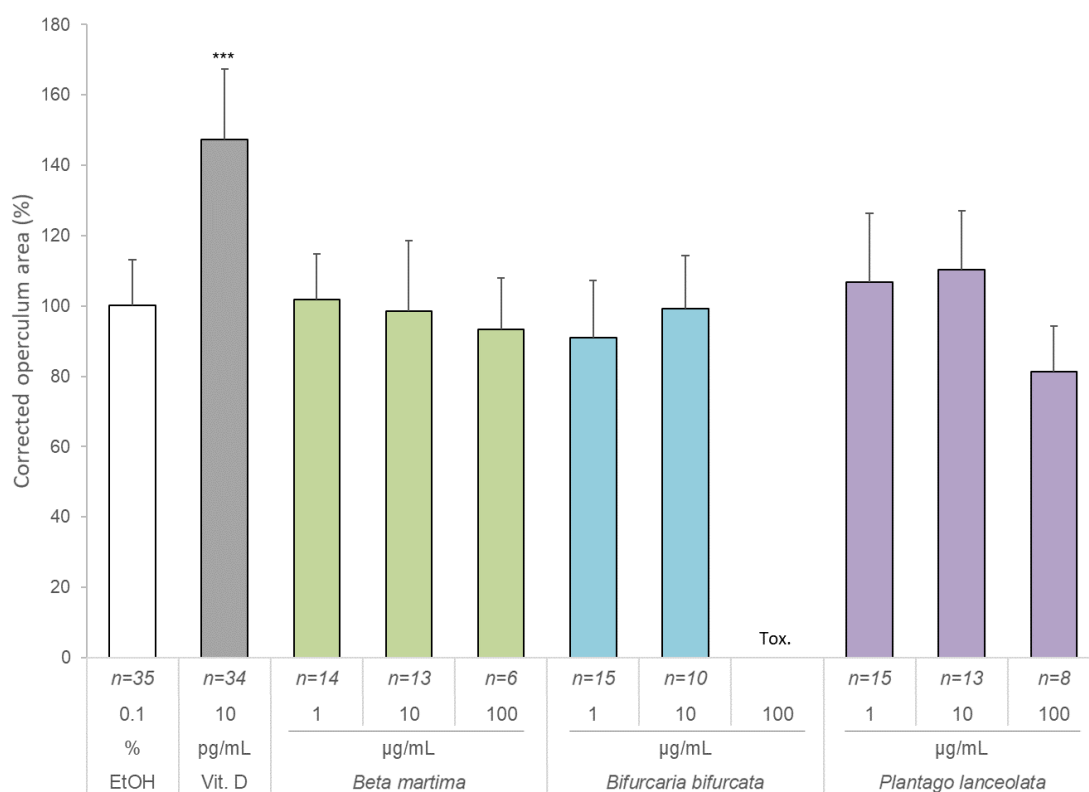
The radical scavenging activities were the highest in FII for all studied species (**Figure III.9**). A significant increase in activity was observed for *B. maritima* with a FII more active than the EA fraction and BHT ( $IC_{50} = 0.22 \pm 0.05 \text{ g.L}^{-1}$ ). Another significant increase was obtained in FII of *C. rupestris* but the activity remained lower than those of the four controls ( $IC_{50} = 2.52 \pm 0.47 \text{ g.L}^{-1}$ ). Despite no activity increase, FII of *B. bifurcata* and *P. lanceolata* were as active as their EA fractions and the three most active controls (ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol and BHA) with  $IC_{50}$  values of  $0.01 \pm 0.02$  and  $0.05 \pm 0.01 \text{ g.L}^{-1}$ , respectively. Two  $IC_{50}$  values could not be precisely determined, *C. rupestris* FI and FIII that both exceeded  $10 \text{ g.L}^{-1}$ .



**Figure III.9.** Radical scavenging activity (DPPH, IC50) of ethyl acetate fractions (EA) and the SPE fractions (FI: H2O fraction, FII: 30% ethanol fraction, and FIII: 100% ethanol fraction) from the macrophytes *Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cladophora rupestris* and *Plantago lanceolata*. Values are means ± SD (n = 3). The y-axis of *C. rupestris* is 3,25-fold higher than the other species. Different letters indicate significant differences in radical scavenging activity (One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test; p < 0.05). BHA: Butylated hydroxyanisole. BHT: Butylated hydroxytoluene

## Osteogenic activity

The analysis of the osteogenic activity were carried out on FII of three species (*B. maritima*, *B. bifurcata* and *P. lanceolata*), in accordance to their high PC concentrations and radical scavenging activities. Analyses did not reveal any osteogenic impact of the purified FII fractions at concentrations ranging from 1 to 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (**Figure III.10**). This loss of activity was observed following SPE purification for the three species. Moreover, the *B. bifurcata* FII was toxic for larvae at 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Figure III.10.** Effect of the SPE FII (30% ethanol fraction) from the macrophytes *Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata* and *Plantago lanceolata* on the mineralization of zebrafish operculum area (% over negative control). Negative control: Ethanol. Positive control: Vitamin D. Values are means  $\pm$  SD. \* indicate values significantly different from the control values (One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## Structural characterization

$^1\text{H-NMR}$  analyses were performed to characterize the composition of SPE fractions compared to the EA fractions from the four species (**Figure III.11**). On each  $^1\text{H-NMR}$  spectrum, the  $\text{D}_2\text{O}$  is characterized by a peak at 4.79 ppm and the MeOD by two peaks at 3.31 and 4.79 ppm.

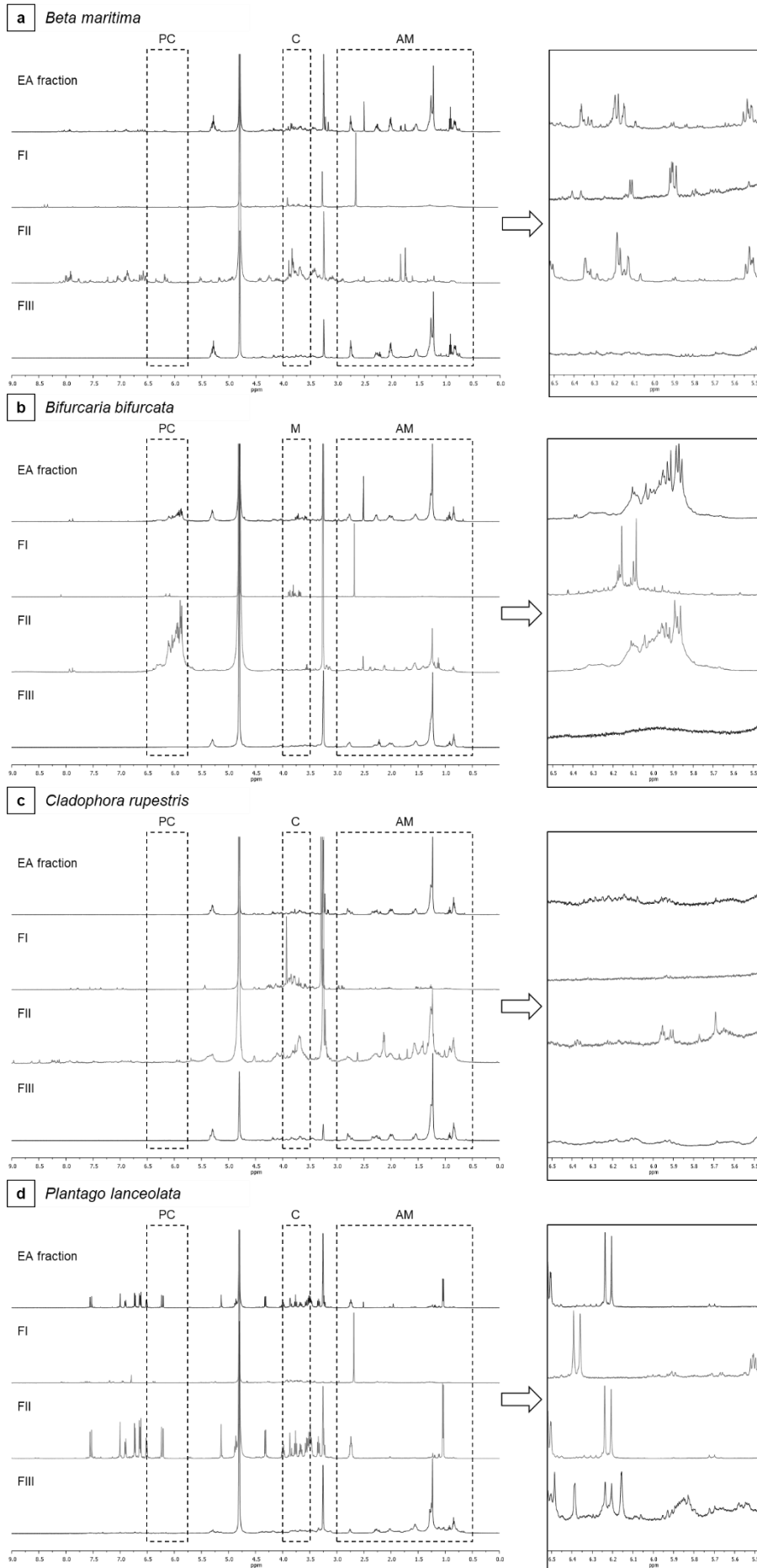
The  $^1\text{H-NMR}$  spectra confirmed the PC content results as the PC signals (5.7-6.5 ppm) were the most intense in FII for *B. maritima*, *B. bifurcata* and *P. lanceolata*, compared to the other fractions.

The *B. maritima* spectra showed a few peaks in the carbohydrate region (3.5-4 ppm) and a main peak around 2.5 ppm for FI; a greatest richness of visible peaks distributed in the three highlighted areas for FII; and numerous peaks grouped between 0.5-3.0 ppm for FIII. In the *B. bifurcata* spectra, the remaining mannitol was accumulated in FI with some aromatic compounds around 6 ppm; FII grouped almost all the PC with high intensity signals which appeared similar to those of the EA fraction with peaks present in the region of apolar compounds; and FIII showed signals in the 0.5-3.0 ppm range only. The *C. rupestris* <sup>1</sup>H-NMR spectra showed the poorest PC signals, FI showed strong carbohydrate signals; FII was more diverse with several intense signals in the apolar compounds area, as well as, in the carbohydrate area with a slight signal that stood out in the aromatic area (5.7-6.5 ppm); FIII was mostly enriched in apolar compounds with a weak carbohydrate signal from the spectrum. The *P. lanceolata* spectra of FII was similar to the EA fraction with similar intensity and well defined signals in all three highlighted areas; FI and FIII spectra showed significantly less signals, which were mainly in the 0.5-3 ppm area with aromatic compound signals in the background.

According to the spectra obtained in <sup>1</sup>H-NMR, FII of both *B. bifurcata* and *P. lanceolata* were selected to characterize their PC by 2D NMR analysis.

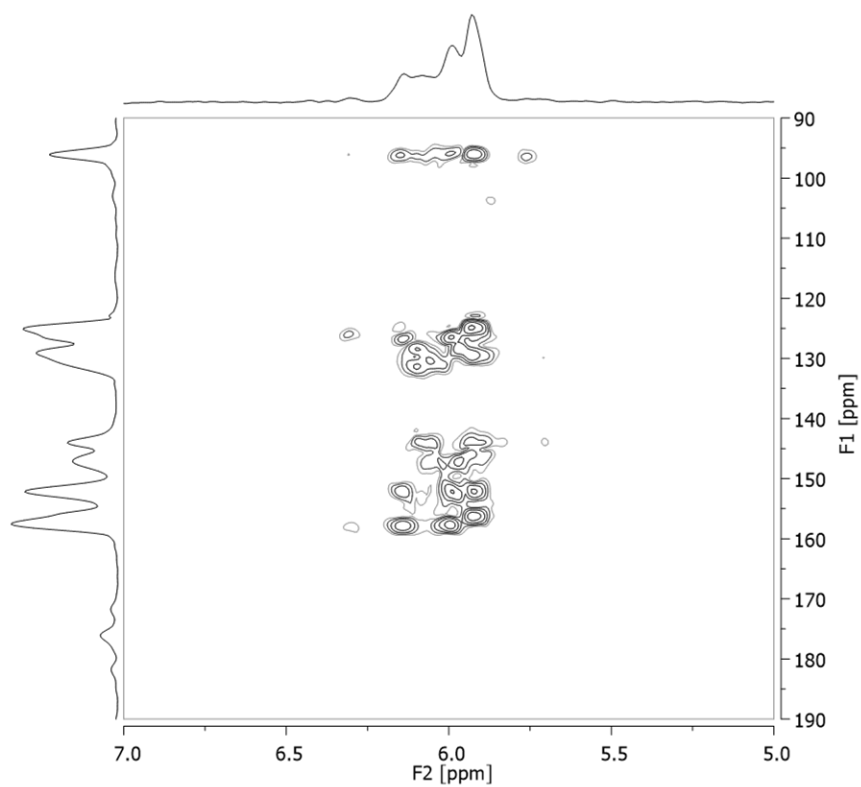
The HMBC spectrum of the purified *B. bifurcata* FII confirmed the presence of PC structure (**Figure III.12**). Indeed, the <sup>1</sup>H chemical shifts between 5.76 – 6.43 ppm were combined with <sup>13</sup>C characteristic resonance zones. The regions of methine substituents on quaternary carbons at 92-97 ppm, aryl-ether bonds linking the phloroglucinol units at 125-128.4 ppm and 151-163.5 ppm, supplementary hydroxyl functions to the 1,3,5 OH originally present in the phloroglucinol unit between 142 – 150 ppm, as well as phenolic carbons at 151 - 163.5 ppm. Thus, the presence of aryl-ether bonds are characteristic of the PC from the phlorethol class and the additional hydroxyl functions are associated with the fuhalols. Moreover, no signal was obtained between 99-103 ppm indicating the absence of aryl-aryl bonds associated to fucols. Finally, no signal at 140 ppm reflected the absence of double aryl-ether linkages between eckols subunits and thus the absence of this class of molecules.

The chemical shift data of the purified *P. lanceolata* FII showed that the major compound was verbascoside, also known as acteoside, by comparing with the literature (**Table III.3**) (Ersöz et al. 2002; Li et al. 2005).



**Figure III.11.**  $^1\text{H-NMR}$  spectra of *Beta maritima* (a), *Bifurcaria bifurcata* (b), *Cladophora rupestris* (c) and *Plantago lanceolata* (d) ethyl acetate fractions (EA) and the SPE fractions (FI: H<sub>2</sub>O fraction, FII: 30% ethanol fraction, and FIII: 100% ethanol fraction) with focus on their aromatic compound area. PC: Phenolic compounds, C: carbohydrates, M: mannitol, and AM: apolar molecules





**Figure III.12.** HMBC assignments of the purified FII (30% ethanol fraction) obtained by SPE purification of the ethyl acetate fraction from the brown macroalga *Bifurcaria bifurcata*

**Table III.3.** Chemical shifts of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  signals of FII (30% ethanol fraction) obtained by SPE purification of the ethyl acetate fraction from the coastal plant *Plantago lanceolata*

Moiety	C position	$\delta_{\text{H}}$ J(Hz)	$\delta_{\text{C}}$
Hydroxytyrosol			
	1		131.5
	2	6.69 d (1.8)	117.1
	3		146.1
	4		144.6
	5	6.67 d (8.2)	116.3
	6	6.56 dd (8.2 / 1.8)	120.5
	$\alpha$	4.04 m. 3.72 m	72.2
	$\beta$	2.79 m	36.5
Glucose			
	1'	4.37 d (7.9)	104.2
	2'	3.38 dd (7.9/9.1)	76.2
	3'	3.81 dd (9.1/9.4)	81.6
	4'	4.91 t (9.4)	70.6
	5'	3.58 m	72.0
	6'	3.52 m. 3.61 m	62.3
Rhamnose			
	1''	5.18 d (1.7)	103.0
	2''	3.91 dd (3.0/1.7)	72.3
	3''	3.57 m	72.0
	4''	3.29 t (9.5)	73.8
	5''	3.54 m	70.4
	6''	1.09 d (6.0)	18.4
Caffeic acid			
	1'''		127.6
	2'''	7.05 d (1.6)	115.7
	3'''		147.4
	4'''		149.8
	5'''	6.77 d (8.3)	116.5
	6'''	6.95 dd (8.3 / 1.6)	123.2
	$\alpha'$	6.27 d (16.0)	115.2
	$\beta'$	7.58 d (16.0)	148.0
	C=O		168.3

## 2.6. Discussion

The objective of this study was to identify bioactive PC with antioxidant and osteogenic properties. Other studies have already highlighted PC from both terrestrial and marine plants as beneficial for bone metabolism, particularly through their antioxidant properties (Habauzit and Horcajada 2008; Surget et al. 2017; Torre 2017; Carson and Clarke 2018; Walsh et al. 2019; Roberto et al. 2021).

### Crude extracts and semi-purified fractions

The choice of extraction and semi-purification protocols was based on two previous studies on macroalgae and halophytic plants (Surget et al. 2017; Roberto et al. 2021). This study focused on *Cladophora rupestris*, a species whose osteogenic activity has already been demonstrated (Surget et al. 2017) and three species (*Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata* and *Plantago lanceolata*) that, to our knowledge, have not yet been shown to possess this activity.

### PC content and radical scavenging activity

PC content determined in the *B. maritima* CE ( $21.95 \pm 1.90 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) was two to three times lower than that obtained by Morales et al. 2014 ( $61.91 \pm 7.51 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) and by Gonçalves et al. 2019 ( $53.70 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ). Moreover, the radical scavenging activity was higher in the CE obtained by Morales et al. 2014 with IC50 value of  $1.35 \pm 0.03 \text{ g.L}^{-1}$  compared to  $2.25 \pm 0.03 \text{ g.L}^{-1}$  in this study. However, Morales et al. (2014) and Gonçalves et al. (2019) used methanol as the extraction solvent, which is known for its efficiency in extracting PC but also for its toxicity (Ar Gall et al. 2015; Jégou et al. 2021). Ethanol was therefore preferred in this study as in other publications (Stiger-Pouvreau et al. 2014; Surget et al. 2017; Gager et al. 2020). The same observation of lower PC content was made for the *B. bifurcata* CE with  $52.26 \pm 8.45 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ , while, Alves et al. (2016) had obtained contents in the *B. bifurcata* CE of  $220.01 \pm 0.01 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$  following an extraction with absolute methanol and hexane. However, Silva et al. 2019 had highlighted a lower PC content for this species ( $10.63 \pm 1.40 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) following extraction with absolute methanol and dichloromethane. A study using a 50% aqueous ethanol extraction obtained a higher content with  $160 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$  (Agregán et al. 2018). It has been demonstrated that PC content of brown macroalgae can change depending on the season, the maturity stage or the location (Connan et al. 2004; Stiger et al. 2004; Audibert et al. 2010; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Gager et al. 2020). The *P. lanceolata* CE exhibited the poorest PC content ( $1.11 \pm 0.55 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) in our study. Mazzutti et al. 2017 compared several techniques such as supercritical CO<sub>2</sub> extraction, ultrasound-assisted extraction and Soxhlet extraction with several solvents for this species and the contents varied between  $2.5 \pm 0.3 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$  and

65.5 ± 0.9 mg.g<sup>-1</sup> DW. A study using an extraction by infusion in water obtained a similar PC content (1.37 ± 0.05 mg.g<sup>-1</sup> DW) (Ferrazzano et al. 2015). Thus, our extraction technique does not seem to be the most efficient to extract high PC quantity for *P. lanceolata*.

Following the liquid/liquid semi-purification, the AQ fractions represented the highest mass yields, however, there was no significant enrichment in PC, except for *P. lanceolata*. On the contrary, the EA fractions were significantly PC-enriched with the exception of *C. rupestris*, whose enrichment was as low as previously observed (Surget et al. 2017). The EA fractions of *B. maritima*, *B. bifurcata* and *P. lanceolata* were the richest in PC, based on biochemical and <sup>1</sup>H-NMR analyses, and had the highest radical scavenging activity as demonstrated in several studies (Stiger-Pouvreau et al. 2014; Ar Gall et al. 2015; Surget et al. 2017; Gager et al. 2020; Roberto et al. 2021). The *B. bifurcata* EA fraction was almost twice as rich as that obtained in a previous study, despite being harvested in the same season and obtained with the same procedure (Gager et al. 2020). The *B. maritima* EA fraction was more active than BHT, and the *B. bifurcata* and *P. lanceolata* EA fractions showed comparable activities to ascorbic acid, α-tocopherol and BHA reflecting high activities. PC are known for their radical scavenging potential due to their chemical structure, the hydroxyl groups can exchange a hydrogen atom or an electron, and their aromatic structure allows them an unpaired electron delocalization (Beara et al. 2009; Dai and Mumper 2010; Sathya et al. 2017; Aminina et al. 2020).

#### Osteogenic activity of the EA fractions on zebrafish larvae

In order to analyze the osteogenic potential of PC-enriched fractions for biomedical applications, we performed *in vivo* assays based on the operculum development of zebrafish larvae. Zebrafish were chosen as a model for the bone homeostasis analysis because of their rapid development, robustness, and known genome with bone formation regulating genes orthologous to those of humans. In addition, their transparent bodies at the embryo stage facilitate the analysis of bone pieces such as the operculum (Laizé et al. 2014; Tarasco et al. 2017; Bergen et al. 2019). The three EA most PC-enriched fractions and most active as radical scavengers improved the operculum development to a level similar to vitamin D (used as positive control). The PC-enriched fractions of *B. maritima*, *B. bifurcata* and *P. lanceolata* possessed pro-osteogenic activities as observed in previous studies on macroalgae and halophytic plants (Karadeniz et al. 2015; Surget et al. 2017; Roberto et al. 2021). The pro-osteogenic activity may reflect a stimulation of the osteoblast activity by increasing their proliferation or their differentiation, however, the current analyses did not allow to determine the impact on these cells (Rao et al. 2008; Wauquier et al. 2009; Karadeniz et al. 2015; Rao and Rao 2015; Kim et al. 2019).

## Solid-phase extraction purified fractions

At this stage of purification, compounds characterization was not possible and a SPE purification was carried out.

## PC content and radical scavenging activity

SPE purification of the four species did not significantly enrich the fractions in PC. FII was the fraction with the highest mass yield for *B. maritima* ( $39.6 \pm 8.5\%$ ) and *P. lanceolata* ( $93.2 \pm 3.0\%$ ), and was associated with a significant increase in radical scavenging activity for *B. maritima*. For *B. bifurcata*, the mass yield was the highest in FI, which was the hydrophilic fraction with a high concentration of mannitol, a polyol that is present in high concentrations in this species (Connan et al. 2004). However, FII was the most PC-enriched and active in the DPPH assay. *C. rupestris* had the highest mass yield in FIII (54.9%) and there was an increase in radical scavenging activity, which however, remained lower than the different positive controls.

A characterization of the major compounds of the *B. bifurcata* and *P. lanceolata* FII was carried out by 2D NMR. The *B. bifurcata* fraction contained phlorethol and fuhalol compounds, whereas the *P. lanceolata* fraction presented mainly verbascoside. Phloroethols and fuhalols are phlorotannins and are exclusively present in brown algae (Cérantola et al. 2006; Singh and Bharate 2006; Stiger-Pouvreau et al. 2014). Several studies on brown algae, have highlighted the presence of bioactive phlorethols with anticancer, antioxidant, antibacterial, photoprotective activities (Li et al. 2011; Tanniou et al. 2014; Le Lann et al. 2016; Malyarenko et al. 2020), and bioactive fuhalols with antioxidant, photoprotective, bactericidal and cytotoxic activities (Nakai et al. 2006; Le Lann et al. 2016; Gonçalves-Fernández et al. 2019), but to our knowledge, no information concerning osteogenic activity has been described until now. Verbascoside, discovered in 1963 in *Verbascum sinuatum*, is the most widespread disaccharide caffeoyl ester and is widely found in the kingdom of terrestrial plants with more than 200 plants, including *Plantago* sp., in 23 families from different orders, mainly, Lamiales, Asterales, Cucurbitales and Magnoliales (Scarpati and Delle Monache 1963; Alipieva et al. 2014). Its potential in the medical field is widely known with properties such as antioxidant, anti-inflammatory, hepatoprotective, immunoregulatory, neuroprotective, antigenotoxic and osteogenic activities (Li et al. 2005; Harput et al. 2012; Alipieva et al. 2014; Wan et al. 2016; Deribew et al. 2018; Gonçalves et al. 2019; Gong et al. 2019; Henn et al. 2019; Yang et al. 2019; Martiniakova et al. 2020). We estimated that about 220 g of dry mass of *P. lanceolata* were needed to produce 1 g of FII almost pure in verbascoside, *i.e.* a yield of about 0.45% by our procedure. This widely studied compound can be produced by "green cell factories" techniques in bioreactor from *Syringa vulgaris* or *Verbascum* sp., or

from industrial by-products such as olive mill waste with better yields than ours and a scale-up already developed (Alipieva et al. 2014).

#### Osteogenic activity of the SPE fractions on zebrafish larvae

The most PC-rich and active SPE fractions have been tested on zebrafish larvae to verify whether osteogenic activity was retained. Unfortunately, no activity was obtained for the *B. maritima*, *B. bifurcata* and *P. lanceolata* FII. This loss of activity may be due to a loss of synergy between compounds that were separated by purification. It is also possible that the purification has modified the conformation of the compounds and thus their activity.

#### Preliminary analysis of the antibacterial activity

Preliminary results regarding the antibacterial activity of the EA fractions on *Staphylococcus epidermidis* DSM 1798 (ATCC 12228) showed growth inhibitory activities for the four species at concentrations between 0.125 - 1 g.L<sup>-1</sup> with complete inhibition for *B. bifurcata* at 0.5 g.L<sup>-1</sup> and *C. rupestris* at 1 g.L<sup>-1</sup> (data not shown). Following SPE purification, the *B. bifurcata* FII was the most active with a MIC equal or lower than 0.125 g.L<sup>-1</sup> and a MBC of 1 g.L<sup>-1</sup>. The *B. bifurcata* FI and FIII showed similar or lower MIC than the EA fraction. The *B. maritima* and *C. rupestris* SPE fractions had a comparable inhibitory behavior with a MIC present only for FIII at 1 g.L<sup>-1</sup>. The *P. lanceolata* SPE fractions did not show MIC; however, FIII was the most active with a growth inhibition between 32 - 64% and FII reached almost 33% at 1 g.L<sup>-1</sup>.

A preliminary analysis was also carried out on *Escherichia coli* DSM 1103 (ATCC 25922) with the *B. bifurcata* and *P. lanceolata* EA fractions, which allowed to observe a high growth inhibition (95% at 1 g.L<sup>-1</sup>) with the *B. bifurcata* fraction. The *B. bifurcata* SPE fractions did not reveal any MIC, however, a significant inhibitory activity was detected for the three fractions (FI: 63.5 ± 7.4% inhibition at 1 g.L<sup>-1</sup>; FII: 34.7 ± 31.6% at 0.5 g.L<sup>-1</sup>; FIII: 35-40% at 0.5 and 1 g.L<sup>-1</sup>). Regarding the different *P. lanceolata* fractions, no MIC could be demonstrated, only FIII displayed growth inhibitory activities around 22% at 0.5 and 1 g.L<sup>-1</sup>. These two bacterial species were used as representatives of Gram positive and Gram negative bacteria frequently involved in bone infections (Birt et al. 2017). Studies on the antibacterial activities of PC, have shown that they can impact the bacterial cell by increasing permeability, destroying the osmotic balance and releasing cellular compounds. This results in a loss of resistance for the damaged cells and biofilm formation is no longer effective (Ferrazzano et al. 2015; Efenberger-Szmechtyk et al. 2021).

These results are therefore promising for therapeutic applications in bone loss as preventive treatment for osteoporosis or as implant coating with osteogenic and antibacterial capacities for the EA fractions, and antibacterial properties for the SPE fractions.

### 2.7. Conclusion

This study highlighted the potential of the *Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata* and *Plantago lanceolata* EA fractions enriched in PC with radical scavenging, antibacterial and bone anabolic activities. The 2D NMR analyses of the purified fractions allowed us to determine the presence of fuhalols and phlorethols in the *B. bifurcata* fraction and of verbascoside in the *P. lanceolata* fraction. These molecules have already demonstrated various bioactivities in previous studies. However, to our knowledge, fuhalols and phlorethols have never been associated with osteogenic activities. SPE separation resulted in the loss of osteogenic activity, suggesting that a synergy between compounds is at the origin of the bone anabolic activities. These results are encouraging for future biomedical applications as therapeutic treatment to improve bone disorders. Additional tests are still needed to complete the potential of these fractions such as antibacterial tests to confirm the preliminary results, as well as tests on mineralogical potential, cytotoxicity and a more precise characterization by mass spectrometry analysis.

### Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by ORBEA, UALG Ethical Committee.

### Authors' contribution

**Buscaglia M.:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - Original draft preparation and Writing - Review & Editing. **Le Blay G.:** Methodology, Writing - Review & Editing, Supervision and Funding acquisition. **Fauchon M.:** Methodology, Investigation. **Kergosien N.:** Methodology, Investigation - Review & Editing. **Laizé V.:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - Review & Editing. **Rosa J. T.:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - Review & Editing. **Simon G.:** Methodology, Investigation. **Cérantola S.:** Methodology, Investigation. **Toueix Y.:** Methodology, Investigation. **Aulanier F.:** Methodology, Investigation. **Negri S.:** Methodology, Investigation. **Guerard F.:** Methodology, Writing - Review & Editing, Supervision and Funding acquisition. **Hellio C.:** Methodology, Writing - Review & Editing, Supervision and Funding acquisition. **Stiger-Pouvreau V.:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - Review & Editing, Supervision and Funding acquisition.

### **Declaration of competing interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### **Acknowledgments**

This study was financially supported by the European Union through the INTERREG Atlantic Programme, under the scope of BLUEHUMAN (EAPA\_151/2016) project. This work was also supported by Biogenouest through the Biodimar team (LEMAR, UBO). The PhD fellowship of Manon Buscaglia was funded by the Conseil Regional de Bretagne and the European Union through INTERREG Atlantic Programme, under the scope of BLUEHUMAN (EAPA\_151/2016).

### **References**

All references are listed at the end of the manuscript to facilitate reading, see the references section on page 209.



### 3. ANALYSES COMPLEMENTAIRES

L'analyse préliminaire de l'activité antibactérienne a été réalisée en suivant le protocole EUCAST afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (MIC) et les concentrations minimales bactéricides (MBC) de nos échantillons. Le protocole est détaillé dans le Chapitre IV dans la partie « Materials and methods » (page 166). Les résultats préliminaires des fractions analysées sont brièvement discutés dans l'article de ce chapitre et les données sont présentées **Tableau III.4** pour les tests sur *Staphylococcus epidermidis* DSM 1798 et **Tableau III.5** pour les tests sur *Escherichia coli* DSM 1103.

**Tableau III.4.** Effet de la fraction acétate d'éthyle (EA) et des fractions SPE (FI : fraction H<sub>2</sub>O, FII : fraction éthanol à 30 %, et FIII : fraction éthanol à 100 %) de *Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cladophora rupestris* et *Plantago lanceolata* sur la croissance bactérienne de *Staphylococcus epidermidis* DSM 1798 par rapport au contrôle sans inhibiteur (croissance à 100 %) (n = 2, moyenne ± SD). \* indique les valeurs significativement différentes des valeurs du contrôle (One-way ANOVA suivie du Dunnett's post hoc test ; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001). Les valeurs en gras indiquent les extraits provoquant une forte inhibition de la croissance, c'est-à-dire une croissance bactérienne inférieure à 20 %. MIC : Concentration minimale inhibitrice ; MBC : Concentration minimale bactéricide

<i>S. epidermidis</i>		Bacterial growth (%)			
Species	Fraction	1 g.L <sup>-1</sup>	0.5 g.L <sup>-1</sup>	0.25 g.L <sup>-1</sup>	0.125 g.L <sup>-1</sup>
<i>Beta maritima</i>	EA	<b>11.9 ± 10.6 ***</b>	25.7 ± 2.9 ***	46.5 ± 5.1 ***	62.2 ± 7.9 ***
	FI	60.7 ± 12.6 ***	78.7 ± 7.3	73.8 ± 11.1 *	58.5 ± 3.2 ***
	FII	67.3 ± 14.3 **	78.8 ± 7.8	88.2 ± 2.4	91.0 ± 0.9
	FIII	<b>MIC ***</b>	26.8 ± 3.8 ***	33.1 ± 17.2 ***	49.5 ± 3.6 ***
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	EA	-	<b>MIC ***</b>	21.4 ± 7.9 ***	22.6 ± 3.3 ***
	FI	<b>MIC ***</b>	29.0 ± 2.8 ***	31.9 ± 1.8 ***	27.6 ± 3.1 ***
	FII	<b>MBC ***</b>	-	-	<b>MIC ***</b>
	FIII	-	<b>MIC ***</b>	32.8 ± 4.4 ***	28.5 ± 3.4 ***
<i>Cladophora rupestris</i>	EA	<b>MIC ***</b>	56.9 ± 6.1 ***	61.7 ± 3.3 ***	59.7 ± 6.7 ***
	FI	62.2 ± 1.0 ***	62.3 ± 4.4 ***	75.6 ± 11.8	75.6 ± 6.0
	FII	49.3 ± 8.9 ***	75.4 ± 0.4	86.8 ± 0.9	77.2 ± 3.7
	FIII	<b>MIC ***</b>	30.0 ± 0.4 ***	43.4 ± 4.7 ***	50.1 ± 1.6 ***
<i>Plantago lanceolata</i>	EA	90.0 ± 28.7	65.9 ± 3.1 **	60.9 ± 0.5 ***	68.4 ± 10.9 **
	FI	108.0 ± 20.5	95.6 ± 6.0	93.5 ± 1.3	95.0 ± 1.6
	FII	67.3 ± 0.8 **	79.8 ± 7.1	86.2 ± 3.4	81.7 ± 4.3
	FIII	36.2 ± 5.0 ***	40.8 ± 11.4 ***	52.9 ± 4.4 ***	68.0 ± 0.5 **

**Tableau III.5.** Effet de la fraction acétate d'éthyle (EA) et des fractions SPE (FI : fraction H<sub>2</sub>O, FII : fraction éthanol à 30 %, et FIII : fraction éthanol à 100 %) de *Bifurcaria bifurcata* et *Plantago lanceolata* sur la croissance bactérienne d'*Escherichia coli* DSM 1103 par rapport au contrôle sans inhibiteur (croissance à 100 %) (n = 3, moyenne ± SD). \* indique les valeurs significativement différentes des valeurs du contrôle (One-way ANOVA suivie du Dunnett's post hoc test ; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001). Les valeurs en gras indiquent les extraits provoquant une forte inhibition de la croissance, c'est-à-dire une croissance bactérienne inférieure à 20 %. MIC : Concentration minimale inhibitrice ; MBC : Concentration minimale bactéricide et nd: non déterminé

<i>E. coli</i>		Bacterial growth (%)			
Species	Fraction	1 g.L <sup>-1</sup>	0.5 g.L <sup>-1</sup>	0.25 g.L <sup>-1</sup>	0.125 g.L <sup>-1</sup>
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	<b>EA</b>	<b>2.1 ± 0.6 ***</b>	52.3 ± 7.7 ***	89.7 ± 3.0	95.0 ± 3.8
	FI	36.5 ± 7.4 ***	88.3 ± 7.3	89.3 ± 4.7	96.1 ± 12.6
	FII	nd	65.3 ± 31.6 ***	97.7 ± 4.0	92.6 ± 14.0
	FIII	60.4 ± 1.0 ***	65.5 ± 1.0 ***	80.0 ± 1.1	79.3 ± 2.9
<i>Plantago lanceolata</i>	<b>EA</b>	76.1 ± 2.9	83.6 ± 1.4	86.4 ± 0.2	86.7 ± 2.2
	FI	nd	nd	nd	nd
	FII	88.4 ± 9.5	89.1 ± 3.4	85.3 ± 1.5	92.8 ± 2.4
	FIII	78.0 ± 5.1 *	77.8 ± 2.9 *	83.9 ± 2.1	81.5 ± 2.5

#### 4. CONCLUSION

Dans ce chapitre, le potentiel de stimulation du développement osseux des fractions enrichies en composés phénoliques de *Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata* et *Plantago lanceolata* a été montré, avec la mise en évidence de bioactivités valorisables notamment dans le domaine médical. En effet, ces fractions ont stimulé l'ostéogénèse des opercules de larves de poissons zèbres, qui présentent des gènes régulant la formation osseuse orthologues à ceux de l'humain, et ont démontré une capacité inhibitrice de la croissance de bactéries Gram-positif voire Gram-négatif. Ces propriétés rendent ces fractions prometteuses pour des applications dans le domaine médical en tant que traitement des pathologies osseuses avec une possible association aux implants osseux pour améliorer la régénération tissulaire, tout en limitant la prolifération bactérienne dans la zone traitée. Ces différentes applications restent à ce jour des pistes pour des travaux futurs car il est nécessaire de poursuivre l'étude sur les mécanismes ostéostimulants, la cytotoxicité potentielle de ces molécules bioactives et la caractérisation précise des molécules par analyse de spectrométrie de masse, par exemple. Cependant, il est à noter que le protocole conventionnel utilisé est long et nécessite une grande quantité de solvants organiques toxiques pour l'humain et l'environnement. Ainsi, il était intéressant de rechercher une méthode plus écoresponsable pour obtenir de tels composés, ce qui est présenté dans le Chapitre IV.

### A RETENIR

Les fractions semi-purifiées acétate d'éthyle de *Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata* et *Plantago lanceolata* ont eu un effet bénéfique sur l'ostéogénèse des opercules de larves de poissons zèbres. La perte d'activité suite à la SPE indique qu'elle résulterait d'une synergie entre des composés.

La purification par extraction sur phase solide (SPE) a permis de caractériser les composés majoritaires des fractions de la macroalgue brune *Bifurcaria bifurcata* (fuhalols et phlorethols) et de la plante halophile *Plantago lanceolata* (verbascoside).

Plusieurs fractions acétate d'éthyle et SPE ont démontré des capacités inhibitrices sur la croissance de *Staphylococcus epidermidis*. La fraction FII de *B. bifurcata* obtenue par SPE était efficace également sur la croissance d'*Escherichia coli*.







---

# **CHAPITRE IV**

COMPOSES PHENOLIQUES BIOACTIFS ISSUS

DE VEGETAUX MARINS ET ISOLES PAR UN

PROCEDE D'EXTRACTION ECORESPONSABLE

---

## 1. PREAMBULE

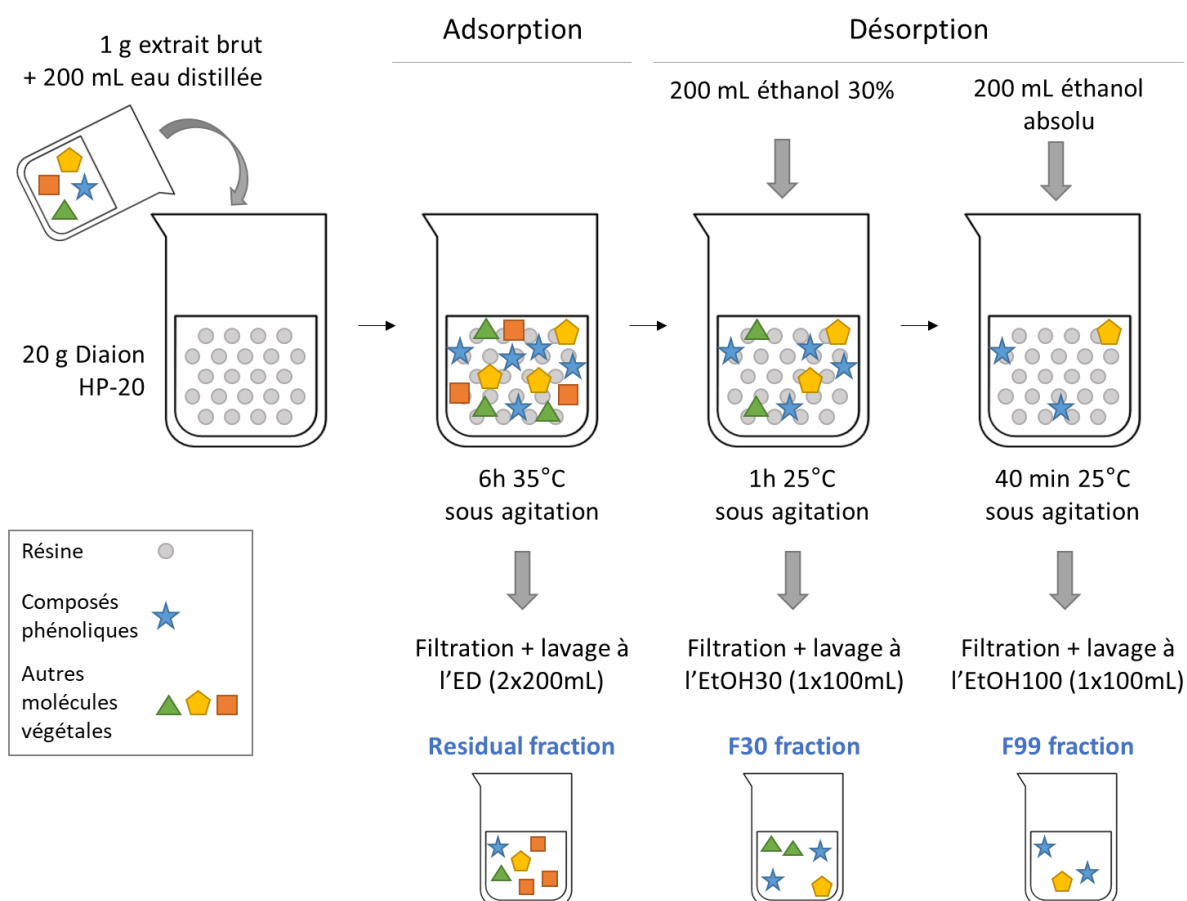
Les macrophytes marins sont reconnus pour leur diversité de métabolites secondaires permettant leur protection face aux stress environnants (Alves et al. 2016; Lalegerie et al. 2020). La famille principale de métabolites de défense est celle des composés phénoliques dont la diversité d'activités a attiré l'attention pour de potentielles valorisations, notamment, dans le domaine de la santé par leurs propriétés antioxydantes, antitumorales, anti-inflammatoires, antifongiques, antivirales et antibactériennes (Zubia et al. 2009; Onofrejevová et al. 2010; Li et al. 2011; Rajauria et al. 2013; Le Lann et al. 2016; Gager et al. 2021). Dans cette étude, nous nous focalisons sur la recherche de composés antibactériens dans le but d'obtenir des molécules biosourcées à partir de biomasses renouvelables. Ces molécules permettraient de répondre au besoin actuel de nouveaux antibactériens, notamment, pour lutter contre les infections osseuses. En effet, ces infections sont difficiles à éradiquer car les bactéries en cause possèdent, notamment, la capacité de former des biofilms protégeant les microorganismes des contraintes physiques, des réponses immunitaires et des stratégies actuelles d'antibiothérapies (Lew and Waldvogel 2004; Chihara and Segreti 2010; Bazargani and Rohloff 2016; Birt et al. 2017). Ainsi protégées, les bactéries peuvent développer des antibiorésistances, ce qui réduit le nombre de molécules efficaces (Chihara and Segreti 2010; Birt et al. 2017). Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles molécules pouvant éliminer ces bactéries, comme les composés phénoliques, qui inhibent naturellement la formation excessive de biofilm à la surface des végétaux (Hellio et al. 2001b; Plouguerné et al. 2008; Shannon and Abu-Ghannam 2016). Cependant, les composés phénoliques sont généralement extraits et purifiés en utilisant des solvants organiques nocifs pour l'humain et l'environnement (Tanniou et al. 2013). Ainsi, dans cette étude, nous avons cherché à mettre en place un procédé écoresponsable pour générer des fractions enrichies en composés phénoliques par une voie de production verte.

Ce chapitre fait suite au Chapitre III dans la recherche de composés phénoliques bioactifs, mais cette fois, par l'utilisation d'un procédé plus écoresponsable chez les espèces ayant démontré un potentiel, *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, *Bifurcaria bifurcata* et *Plantago lanceolata*, ainsi que chez deux espèces supplémentaires, *Codium fragile* et *Crithmum maritimum*, afin de diversifier les composés et tester le protocole sur d'autres modèles. Les composés ont été extraits par macération et purifiés sur une résine macroporeuse Diaion HP-20 (Figure IV.1) suivie d'une chromatographie Flash (FC) (Figure IV.2). Une approche de bioguidage a été mise en place. Les teneurs en composés phénoliques ont été mesurées tout au long du processus au laboratoire, et la répartition chimique au sein des échantillons a été suivie par résonance magnétique nucléaire du proton (<sup>1</sup>H-RMN) ou RMN en deux dimensions (HMBC) à la plateforme RMN-RPE de l'UBO. La bioactivité des échantillons a été analysée au laboratoire au fil de la procédure, afin de déterminer les activités antiradicalaires par le test du DPPH

(2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) et antibactériennes par une méthode EUCAST de microdilution en milieu de culture liquide.

**L'objectif principal de ce chapitre est ainsi de générer et caractériser des fractions enrichies en composés phénoliques bioactifs en suivant un protocole écoresponsable.**

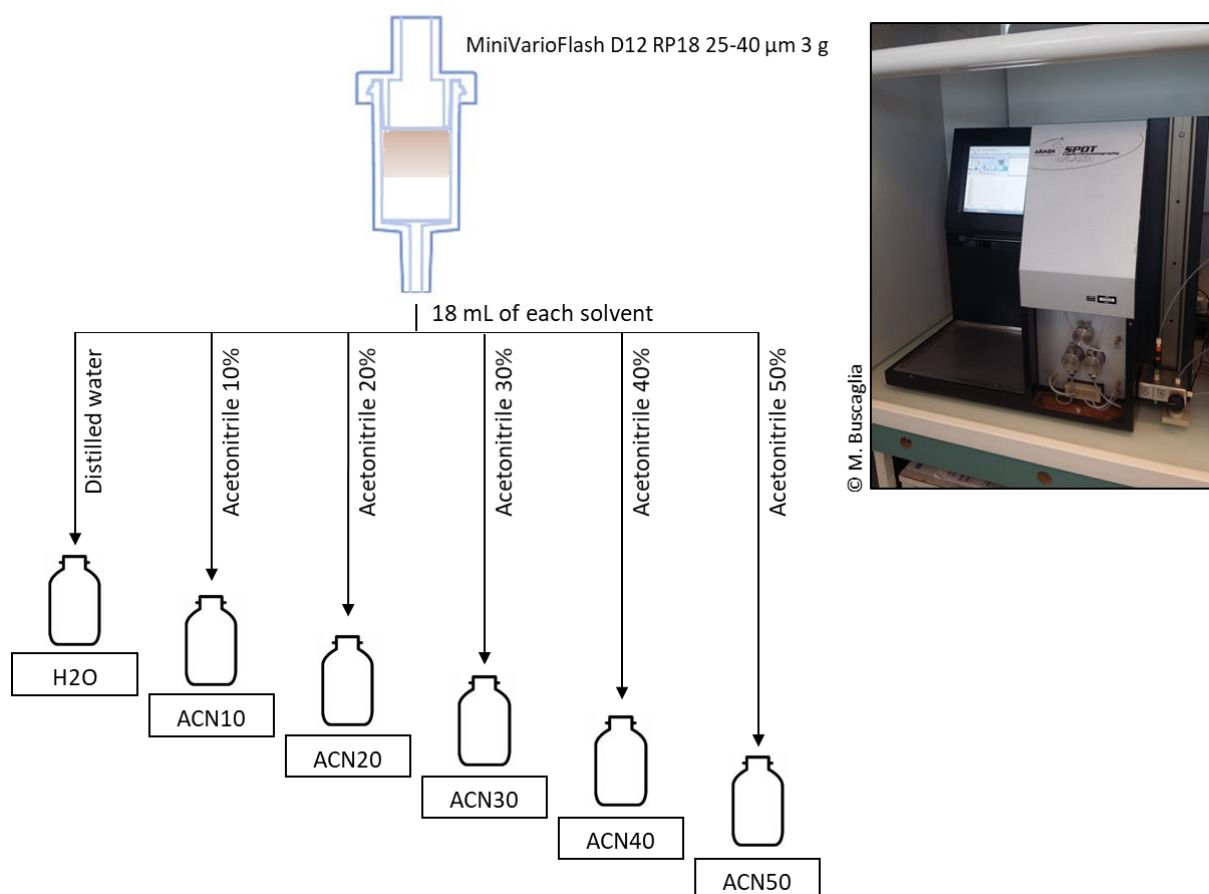
La stratégie de purification est représentée par la **Figure IV.1** et la **Figure IV.2**, les protocoles sont détaillés dans la partie « Materials and methods » de l'article scientifique page 166. Brièvement, la première étape est une purification sur une résine DIAION HP-20 qui consiste à mettre l'extrait brut, solubilisé dans de l'eau distillée, au contact des billes de résine échangeuse d'ions. Les composés phénoliques sont adsorbés par la résine, puis deux étapes de désorption sont réalisées avec de l'éthanol 30% et de l'éthanol absolu comme solvants d'élution. Les deux fractions générées, F30 et F99, contiennent la majorité des composés phénoliques issus de l'extrait brut.



**Figure IV.1.** Protocole de la purification par résine macroporeuse Diaion HP-20 réalisée sur les extraits bruts.



La deuxième étape est un fractionnement sur une colonne MiniVarioFlash RP18 (Merck, France). La fraction F30 est déposée sur la colonne puis différents solvants sont utilisés successivement pour former six fractions selon un gradient d'élution de polarité décroissante d'acétonitrile (ACN) par pas de 10%. Les fractions formées sont H2O, ACN10, ACN20, ACN30, ACN40 et ACN50. Le but est de purifier et concentrer les composés phénoliques dans différentes fractions, ce qui permet notamment de les caractériser



**Figure IV.2.** Protocole de chromatographie Flash réalisée sur la fraction F30 de *Bifurcaria bifurcata* (à gauche). Chromatographie Flash/UV Spot Flash d'Armen Instrument (France) de la plateforme Biodimar (à droite).

## 2. MANUSCRIT DU TROISIÈME ARTICLE SCIENTIFIQUE

### **Eco-friendly procedure to generate valuable active and antibacterial polyphenolic purified fractions from marine macrophytes**

Manon Buscaglia<sup>1</sup>, Gwenaëlle Le Blay<sup>1</sup>, Marilynne Fauchon<sup>1,2</sup>, Noémie Gloanec<sup>1,2</sup>, Yannick Toueix<sup>1,2</sup>, Fanny Aulanier<sup>1,2</sup>, Steven Negri<sup>1,2</sup>, Stéphane Cérantola<sup>3</sup>, Fabienne Guérard<sup>1</sup>, Valérie Stiger-Pouvreau<sup>1</sup> & Claire Hellio<sup>1,2</sup>

*(1) Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, F-29280 Plouzané, France*

*(2) Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, Plateforme Biodimar, F-29200 Brest, France*

*(3) Univ Brest, Plateforme RMN-RPE, F-29200 Brest, France*

*Corresponding author at: Université de Brest, Institut Universitaire Européen de la Mer, IUEM/UBO, Laboratoire des sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539 LEMAR, Technopôle Brest Iroise, Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France*

E-mail: [valerie.stiger@univ-brest.fr](mailto:valerie.stiger@univ-brest.fr) (V. Stiger-Pouvreau)

**Keywords:** Antibacterial activity / *Bifurcaria bifurcata* / Macroalgae / Macroporous adsorption resin / Phlorotannins

## 2.1. Résumé

Cette étude a porté sur les composés phénoliques (PC) bioactifs de cinq macrophytes collectés sur les côtes du Nord-Ouest de la France : *Bifurcaria bifurcata*, *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, *Codium fragile*, *Crithmum maritimum* et *Plantago lanceolata*. Les PC ont été obtenus par un procédé innovant et respectueux de l'environnement. L'extraction a été réalisée par un mélange eau-éthanol, le fractionnement primaire a été réalisé sur une résine macroporeuse Diaion HP-20 et la purification a été faite par chromatographie flash (FC) afin de réduire l'utilisation de solvants toxiques dans un contexte de procédé durable. La quantification des PC par le test de Folin-Ciocalteu a permis d'en déterminer la teneur dans chaque fraction et la résonance magnétique nucléaire du proton ( $^1\text{H-RMN}$ ) a permis d'observer la distribution des différents métabolites d'intérêt tout au long des étapes de purification. Les bioactivités étudiées étaient la capacité antiradicalaire analysée par le test 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyl (DPPH), et l'activité antibactérienne évaluée par une méthode EUCAST de microdilution en bouillon sur des bactéries de référence et cliniques (bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif). La procédure de purification par la Diaion HP-20 a permis l'enrichissement des fractions en PC pour toutes les espèces étudiées combiné à une augmentation de la capacité antiradicalaire. Une fraction Diaion, la fraction F30 de *B. bifurcata*, a démontré une activité antibactérienne contre les souches de staphylocoques. Après la purification de cette fraction F30 par la FC en utilisant un gradient d'acétonitrile (ACN), la présence de fucophloréthols bioactifs a été démontrée en utilisant une analyse RMN 2D. Les propriétés associées à cette fraction peuvent être valorisées pour des applications biotechnologiques comme agents conservateurs et/ou antimicrobiens dans la cosmétique, l'alimentation et la médecine.

## 2.2. Abstract

This study focused on the bioactive phenolic compounds (PC) of five macrophytes collected from the coasts of NW France: *Bifurcaria bifurcata*, *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, *Codium fragile*, *Crithmum maritimum* and *Plantago lanceolata*. PC were obtained by an innovative and eco-friendly procedure. The extraction was performed with aqueous ethanol, the primary fractionation was made by Diaion HP-20 macroporous resin and the purification was done by Flash chromatography (FC) in the order to reduce the use of toxic solvents in a sustainable way. PC quantification by Folin-Ciocalteu assay allowed the determination of PC contents of each fraction and proton nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ) was used to check the distribution of the different metabolites of interest throughout the purification. The bioactivities investigated were the radical-scavenging capacity analyzed by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, and the antibacterial activity evaluated by an EUCAST broth microdilution method on reference and clinical bacteria (Gram-positive and Gram-negative bacteria). The purification procedure by the Diaion HP-20 allowed the enrichment of the fractions in PC for all the studied species combined with an increase of the radical scavenging capacity. One Diaion fraction, *B. bifurcata* F30 fraction, emerged from the screening with antibacterial activity against staphylococcal strains. Following the purification of this F30 fraction by FC with an acetonitrile (ACN) gradient, the presence of bioactive fucophlorethols was demonstrated using a 2D NMR analysis. The properties associated with this fraction can be valued for biotechnological applications as preservative and/or antimicrobial agents in cosmetics, food and medicine.

### 2.3. *Introduction*

Marine macrophytes (macroalgae and coastal plants) are important and sustainable sources of bioactive compounds as they produce a wide variety of secondary metabolites, which are part of their defense strategies in response to their competitive environment (Alves et al. 2016; Lalegerie et al. 2020). Among them, phenolic compounds (PC) are characterized by a phenol core with hydroxyl groups harboring a wide diversity of structures, polarities and activities. They represent one of the largest family of secondary metabolites with more than 8000 characterized compounds, ranging from simple to highly polymerized structures (Grassmann et al. 2002; Audibert et al. 2010; Dai and Mumper 2010; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Abu Khalaf et al. 2019). They are divided into four main groups: phenolic acids, flavonoids, stilbenes and tannins (Alara et al. 2021). Phenolic acids are simple molecules with two subcategories, the benzoic acid derivatives such as gallic acid, and the cinnamic acid derivatives. Flavonoids are characterized by a flavan nucleus with six sub-groups (flavones, flavanones, flavonols, flavanols, anthocyanins, and isoflavones) and are mainly found in terrestrial plants (Dai and Mumper 2010; Tanniou et al. 2013; Alara et al. 2021). Stilbenes are minority compounds mainly represented by resveratrol. Finally, tannins are divided into two groups, condensed tannins based on flavan-3-ol, and hydrolysable tannins derivatives of gallic acid and glucose for green lineage, and based on phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) for brown algae, called phlorotannins (Audibert et al. 2010; Dai and Mumper 2010; Tanniou et al. 2013; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Alara et al. 2021). The latter category is divided into four subclasses according to the linkage between phloroglucinol units: fucols with aryl-aryl linkage, fuhals and phlorethols with ether linkage, fucophlorethols with both previous linkages, and eckols and carmalols with dibenzodioxin linkage, not found in terrestrial plants (Cérantola et al. 2006; Singh and Bharate 2006). PC are chemical defenses combating harmful abiotic factors such as UV radiation or oxidative stress, as well as biotic stresses induced by epiphytes, pathogens and grazers (Connan et al. 2004; Onofrejevá et al. 2010; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Lalegerie et al. 2020). These compounds are characterized by a broad spectrum of biological activities such as antioxidant, antitumor, anti-inflammatory, antifungal, antibacterial and antiviral activities that may be of interests for human health (Zubia et al. 2009; Onofrejevá et al. 2010; Li et al. 2011; Rajauria et al. 2013; Le Lann et al. 2016). These properties have attracted the attention of scientists for decades for applications as anti-aging agents by scavenging free radicals in cosmetics, as well as preservative or antimicrobial agents in cosmetics, food and medicine (Grassmann et al. 2002; Audibert et al. 2010; Le Lann et al. 2016; Stiger-Pouvreau and Guerard 2018; Gager et al. 2020). Moreover, these molecules are produced and extracted from natural renewable biomass, which is part of an economical and sustainable approach based on the twelve green chemistry principles (Clark 1999; Anastas and Eghbali 2010). Since few years, there is an increasing interest for products with natural origins to limit the use

of synthetic compounds, such as synthetic antioxidant, which may be toxic (Zubia et al. 2009; Plaza et al. 2010; Rajauria et al. 2013; Tanniou et al. 2013; Heffernan et al. 2015). However, the current processes of PC extraction and isolation such as solid/liquid extraction, which uses methanol, or liquid/liquid purification, which requires toxic organic solvents, such as dichloromethane or acetone, are not eco-friendly (Tanniou et al. 2013).

In this study, the bioprospecting of valuable antioxidant and antibacterial molecules was performed on five marine macrophyte species using an easily scaling up and more eco-friendly process than traditional methods. For this, a hydroethanolic solid/liquid extraction was chosen, followed by a primary fractionation using a Diaion HP-20 macroporous resin. This resin has the advantages of being reusable, inexpensive, and compatible with ethanol, a food grade solvent, to separate PC from other compounds (Kim et al. 2014; Leyton et al. 2017; Koshi et al. 2019). This adsorbent resin in the form of non-polar copolymer styrene-divinylbenzene microbeads captures PC through hydrophobic binding and aromatic stacking (Leyton et al. 2017).

In order to study the diversity of PC within macrophytes, five species from the Brittany coasts (NW France) were selected from various phylogenetic lineages in order to widen the spectrum of tested compounds. Two macroalgae *Bifurcaria bifurcata* R.Ross (Phaeophyceae, Sargassaceae) and *Codium fragile* (Suringar) Hariot (Ulvophyceae, Codiaceae), and three coastal plants *Beta vulgaris* subsp. *maritima* (L.) Arcang. (Magnoliopsida, Amaranthaceae), also known as *Beta maritima*, *Crithmum maritimum* (L.) (Magnoliopsida, Apiaceae), and *Plantago lanceolata* (L.) (Magnoliopsida, Plantaginaceae) were collected. They were selected based on their potential to produce bioactive compounds: *B. bifurcata* was already known for its richness in bioactive PC, especially fuhualols, that displayed antioxidant, antifouling, antitumoural and antimicrobial activities (Maréchal et al. 2004; Zubia et al. 2009; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Alves et al. 2016; Agregán et al. 2018). *C. fragile* has demonstrated osteogenic and pro-mineralogical properties associated with its PC in a previous study (Surget et al. 2017). *B. maritima* is used in traditional medicine to treat digestive disorders, anemia as well as, burns and throat pain thanks to their antioxidant PC (Biancardi et al. 2012; Morales et al. 2014). *C. maritimum* PC displayed antioxidant and antimicrobial properties in previous studies (Meot-Duros et al. 2008; Meot-Duros and Magné 2009; Pereira et al. 2017). *P. lanceolata* is also used in traditional medicine since it contains active flavonoids (apigenin, luteolin, baicalein or nepetin) with antibacterial activities against Gram-negative and Gram-positive bacteria, anti-inflammatory or wound-healing properties (Beara et al. 2009; Radu et al. 2010; Alemu and Andualem 2014; Gonçalves and Romano 2016). The present study was conducted in the framework of the Interreg project BlueHuman and investigated these properties with the aim to provide high added-value products in the field of biomedicine, in particular, in the context of aiding bone regeneration and limiting bacterial infections.

Therefore, antibacterial activity tests were conducted on bacterial strains frequently present in bone infections such as *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* (Bikels-Goshen et al. 2010; Chihara and Segreti 2010; Birt et al. 2017). These bacteria possess a high virulence factor by the formation of biofilms. The biofilms create beneficial environments to bacterial development and a protection against external aggressions by limiting mechanical erosion, infiltration of host immune defenses, and diffusion of antibiotics (Lew and Waldvogel 2004; Chihara and Segreti 2010; Bazargani and Rohloff 2016; Birt et al. 2017). As a result, resistance to antibiotics can appear (Chihara and Segreti 2010; Birt et al. 2017). In this context, it is necessary to find new antibacterial molecules.

Bioguided purification of PC was performed by analyzing the PC contents of the extracts/fractions through the purification steps by the Folin-Ciocalteu assay (aromatic compounds quantification) (Zubia et al. 2009), and through proton nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ) (as aromatic compounds are visible in the region of 5.7 - 6.5 ppm of a  $^1\text{H-NMR}$  spectrum) (Cérantola et al. 2006; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Vissers et al. 2017). Associated activities for cosmetic, food or medical valorization were also researched on crude extracts and purified fractions: the radical scavenging activity estimated by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay (Le Lann et al. 2016), and the antibacterial activity evaluated by an EUCAST broth microdilution method (Bonnet et al. 2017).

The aim of this study was then to use an eco-friendly procedure for the extraction and the purification of compounds to generate active PC-enriched fractions with antibacterial and radical scavenging activities, a procedure which can be used in both macroalgae and halophytes.

## 2.4. Materials and methods

### 2.4.1. Material origins

Biological material sampling

The five species of marine macrophytes were collected on the NW France, Atlantic coasts (Brittany): two macroalgae *Bifurcaria bifurcata* and *Codium fragile*, and three coastal plants *Beta maritima*, *Crithmum maritimum* and *Plantago lanceolata*. Specimens were harvested by hands at low tide in late October/early November 2018 at the Pointe du Diable (48°21'14.7"N, 4°33'32.2"W, Plouzané, Brittany, France) for *B. bifurcata*, *C. maritimum* and *P. lanceolata*, and at Porsmeur creek (48°28'58.1"N, 4°46'11.6"W, Porspoder, Brittany, France) for *B. maritima* and *C. fragile*. The plants were cut at 5 cm from the base with scissors to minimize the environmental impact and allow the regrowth. Once back to the laboratory, they were washed with tap water to remove residual salts and epibionts. Samples were then cut into pieces, frozen at -20°C and freeze-dried (Alpha 1-4 LD, Christ, France), before grinding with a planetary ball mill (PM 400, Retsch, France) to obtain a fine powder.

## Chemical materials

All used chemicals and reagents were analytical grade. Absolute ethanol, Folin-Ciocalteu's reagent, sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), phloroglucinol, gallic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, dimethylsulfoxide (DMSO), gentamicin, Mueller-Hinton Broth (MHB) and bacteriological agar were purchased from Grosseron (France). Acetonitrile (ACN) and tryptone soy broth (TSB) were obtained from VWR (France). Butylated hydroxytoluene (BHT) and sodium chloride (NaCl) were purchased from Sigma-Aldrich (France). NMR solvents as deuterium oxide ( $\text{D}_2\text{O}$ ) and methanol-d4 (MeOD) were obtained by eurisotop (Germany).

## Bacterial strains

*Escherichia coli* DSM 1103 (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* DSM 2569 (ATCC 29213), *S. aureus* DSM 346 (ATCC 6538P) and *Staphylococcus epidermidis* DSM 1798 (ATCC 12228) with known sensitivities to gentamicin were used as controls in the *in vitro* inhibition tests. They were obtained from Institut Leibniz DSMZ (Germany). Clinical isolates from patients suffering from bone infections: *E. coli* «Bri», and *S. aureus* «Lag» and «Vla», were obtained from the bacteriology department of the CHRU (Centre Hospitalier Régional et Universitaire, Brest, France). All strains were checked on API® galleries (Biomérieux, France) and stored at  $-80^\circ\text{C}$  in cryotubes.

### 2.4.2. Extraction and purification of phenolic compounds

#### Solid/liquid extraction

Crude extracts were produced by solid/liquid extraction (Le Lann et al. 2008; Surget et al. 2015). Briefly, 5 g of macrophyte powder were extracted in 50 mL of ethanol:distilled water (30:70, v/v) for 2 h at  $40^\circ\text{C}$  in the dark under stirring. The supernatant was collected after a 5-minute centrifugation at 3000 g at  $10^\circ\text{C}$  (Eppendorf Centrifuge 5810R, Germany). The powder was extracted twice more using the same procedure in 1-hour phase with supernatant recovery. The supernatants were then pooled, evaporated (Rotavapor RII, BUCHI, France) and frozen at  $-20^\circ\text{C}$  before being freeze-dried (Alpha 1-4, CHRIST, France) forming the crude extract.

#### Primary fractionation by the Diaion HP-20 macroporous resin

Primary fractionation of the crude extracts was performed using Diaion HP-20 (Sigma-Aldrich, France) according to the protocol adapted from Kim et al. (2014). Briefly, 20 g of the resin were pre-weighed in a closable flask and conditioned with absolute ethanol (100 mL) under continuous stirring for at least 12h at  $25^\circ\text{C}$ . The resin was then washed four times with distilled water (100 mL) and slightly dried by filtration. One gram of crude extract was solubilized in 200 mL of distilled water



and placed in contact with the resin for 6h at 35°C under continuous stirring in the dark. After adsorption, the resin was filtered with a grade 4 Whatman filter and washed twice with 200 mL of distilled water. The filtrate containing the crude extract residue was recovered to analyze the non-adsorbed compounds and was named “residual fraction”. The first resin desorption step was performed with 200 mL of ethanol:water (30:70, v/v) for 1h at 25°C under continuous stirring in the dark. The liquid fraction was recovered by filtration as previously and the resin was rinsed with 100 mL of ethanol:water (30:70, v/v) that were added to the liquid fraction to form the Diaion fraction named “F30 fraction”. The second step was performed as the previous one by using 100 mL of absolute ethanol, this second Diaion fraction was named “F99 fraction”. The two Diaion fractions were evaporated using a rotary evaporator (Rotavapor RII, BUCHI, France), freeze-dried (Alpha 1-4, CHRIST, Grosseron, France) and stored at -20°C.

#### Purification by Flash chromatography

The Flash chromatography (FC) purification protocol was adapted from [Zubia et al. \(2009\)](#). The hydrophilic *B. bifurcata* F30 fraction was selected for this step. The column used was a MiniVarioFlash D12 RP18 25-40 µm 3 g (Merck, France) placed on SPOT Liquid Chromatography Flash (Armen Instrument, France) ([Zubia et al. 2009](#); [Jurisic Grubescic et al. 2013](#); [Rajauria 2018](#)). The column was conditioning with ACN (20 mL) and distilled water (20 mL) successively, and charged with the F30 fraction (50 mg) solubilized in distilled water (0.5 mL). The separation was carried out by an elution gradient with decreasing polarity from distilled water to ACN:distilled water (30:70, v/v) by 10% steps. Four FC fractions named “H2O fraction”, “ACN10 fraction”, “ACN20 fraction” and “ACN30 fraction” were obtained (fractions with higher ACN concentration did not have enough mass to be analyzed). The elution volume of each solvent corresponded to *ca* four column volumes (18 mL) with a flow rate of 6 mL.min<sup>-1</sup>. All generated FC fractions were evaporated (Rotavapor RII, BUCHI, France), freeze-dried (Alpha 1-4, CHRIST, France) and stored at -20°C prior to analysis.

### 2.4.3. Determination of biological activities

#### Radical scavenging activity

The radical scavenging activities for all samples were measured by the DPPH assay adapted from [Le Lann et al. \(2016\)](#). Briefly, 22 µL of sample were mixed in a 96-well microplate (Greiner Bio One, France) with 200 µL of DPPH solution at 25 mg.L<sup>-1</sup> prepared within 24h. They were incubated 1h in the dark at room temperature before reading the absorbance at 540 nm (Infinite M200, TECAN, France). Distilled water and absolute ethanol were used as negative controls, and ascorbic acid, α-tocopherol and BHT (all with a concentration from 0.001 to 1 g.L<sup>-1</sup>) were selected as positive controls.

The radical scavenging activity was expressed by the inhibition concentration, known as IC<sub>50</sub> (g.L<sup>-1</sup>), which represents the sample concentration neutralizing 50% of the radical DPPH. The IC<sub>50</sub> value was estimated by a linear regression analysis and a low value corresponds to a high radical scavenging activity. This analysis was carried out in triplicate for each sample.

#### Determination of antibacterial activity

The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined using the EUCAST broth microdilution method (Bonnet et al. 2017). All manipulations were done in sterile conditions.

**Sample preparation.** All crude extracts, Diaion fractions and FC fractions were tested for antibacterial activity. They were dissolved in sterile distilled water (2 g.L<sup>-1</sup>) or DMSO (0.2 g.L<sup>-1</sup>) depending on their solubility. The latter were first solubilized in pure DMSO (10 g.L<sup>-1</sup>), and then diluted in sterile water to reach a final concentration of 0.2 g.L<sup>-1</sup> in a 2% DMSO solution. During the antibacterial test, all samples were diluted by half to reach a final concentration of 1% DMSO which does not affect bacterial growth (Nostro et al. 2000).

**Inoculum preparation.** All bacterial strains were kept frozen at -80°C. Before use, they were subcultured twice in TSB, spread on tryptone soy agar (TSA) and incubated for 18h at 37°C. Just before use, isolated colonies were transferred in a 0.85% NaCl solution and the optical density was adjusted to a MacFarland index of 0.5, which corresponds to ca 1.10<sup>8</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>, by using a densitometer (DEN-1B Grant-bio, Grosseron, France). This bacterial suspension (0.5 mL) was diluted in MHB 1X (9.5 mL) to obtain an inoculum at 5.10<sup>6</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>.

**Microdilution assay in 96-well microplates.** For each tested sample, two wells of the first column were filled with 90 µL of double concentrated MHB (2X). Ninety microliters of samples, solvent (sterile distilled water or DMSO 2%) (negative control) or gentamicin (2 mg.L<sup>-1</sup>) (positive control) were homogenized in the first well of each dilution series and a serial two-fold dilution was done in the three successive columns containing 90 µL of MHB 1X. The 90 µL taken from the last well were discarded. Each well was then inoculated with 10 µL of the freshly prepared inoculum to reach a final concentration of 5.10<sup>5</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>. Final sample concentrations varied in the dilution order from 1 to 0.125 g.L<sup>-1</sup> for those dissolved in distilled water and from 0.1 to 0.0125 g.L<sup>-1</sup> for those dissolved in DMSO. Gentamicin was tested from 1 to 0.125 mg.L<sup>-1</sup>. Non inoculated MHB plus sterile water or DMSO, and non inoculated MHB plus tested samples, incubated in the same plate, were used respectively as blank and color controls. The plate was sealed to prevent evaporation and incubated for 18h at 37°C. After this period, the final optical density (OD) was measured at 620 nm (Multiskan Sky, Thermo

Scientific, France) to determine the MIC, which was defined as the lowest concentration showing a complete inhibition of the tested bacterial strain. The bacterial growth was calculated as follows:

$$\text{Bacterial growth (\%)} = \left[ \frac{\text{OD sample} - \text{OD color control}}{\text{OD negative control} - \text{OD blank}} \right] \times 100$$

The MBC corresponds to the concentration that kills 99.9% of the initial inoculum (Cleusix et al. 2007). It was determined by spotting 20  $\mu\text{L}$  from the wells showing no visible growth on Mueller-Hinton Agar (MHA) for 24h at 37°C. The MBC was defined as the lowest concentration at which no growth was observed on a MHA plate. This analysis was carried out in six replicates.

#### 2.4.4. Quantity and structural elucidation

##### Total phenolic content

Total phenolic contents for all samples were determined with the Folin-Ciocalteu assay adapted from Zubia et al. (2009). Briefly, 20  $\mu\text{L}$  of sample or standard, 130  $\mu\text{L}$  of distilled water, 10  $\mu\text{L}$  of Folin-Ciocalteu reagent and 40  $\mu\text{L}$  of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (200  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were mixed in the microplate wells (Greiner Bio One, France). The microplate was incubated 10 min at 70°C in the dark and the reaction was stopped by placing the plate for 10 min on ice. The final absorbance was measured at 620 nm (Infinite M200, TECAN, France). The total phenolic content was then expressed from standard curves in milligram per gram of dry sample ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  DW). Phloroglucinol (for brown macroalgae) and gallic acid (for green lineage) were used as standards. This analysis was carried out in triplicate for each tested sample.

##### NMR analyses

$^1\text{H}$ -NMR analyses were used to follow the PC through all purification steps. Spectra were obtained using a Bruker Avance 400 MHz NMR spectrometer (Bruker, France) on 5 mg of each sample dissolved with 700  $\mu\text{L}$  of  $\text{D}_2\text{O}$  or MeOD depending on the sample solubility. Spectra were processed with MestReNova software (v6.0.2-5475). A spectrum presents the chemical shifts of protons expressed in ppm and helps to determine chemical groups present in the sample. Signals between 5.7 and 6.5 ppm are characteristic of aromatic compounds (Cérantola et al. 2006; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Vissers et al. 2017)

Heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) experiments provided information on the nature of the PC of the most purified sample of *B. bifurcata* using Bruker Avance III HD 500 MHz NMR

spectrometer (Bruker, France) that provides the chemical shifts of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  expressed in ppm. The different signals on the HMBC analyses were interpreted in reference to Cérantola et al. (2006) and Vissers et al. (2017).

#### 2.4.5. Statistical analyses

Laboratory analyses were performed in triplicate (Folin-Ciocalteu and DPPH assays) or in six repetitions (antibacterial tests), and results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). All statistical analyses were performed with RStudio (v.1.2.1335) integrated R (v.3.6.1). The significance of differences between phenolic content and activity tests within and between species, was tested by One-way Analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's or Dunnett's multiple comparison tests ( $p < 0.05$ ). All data were checked for normality (Shapiro–Wilk's test) and homoscedasticity (Bartlett's test) ( $p < 0.05$ ). In the case where data were not normally distributed or not homogenous for variances, ANOVA were still performed as it remains robust to low heteroscedasticity and low skewness or kurtosis of the data distributions, as demonstrated in Underwood et al. (1997). Pearson's correlation ( $r$ ) was calculated between PC content and IC50 values ( $p < 0.01$ ). All graphs produced were performed using the software Excel 2016.

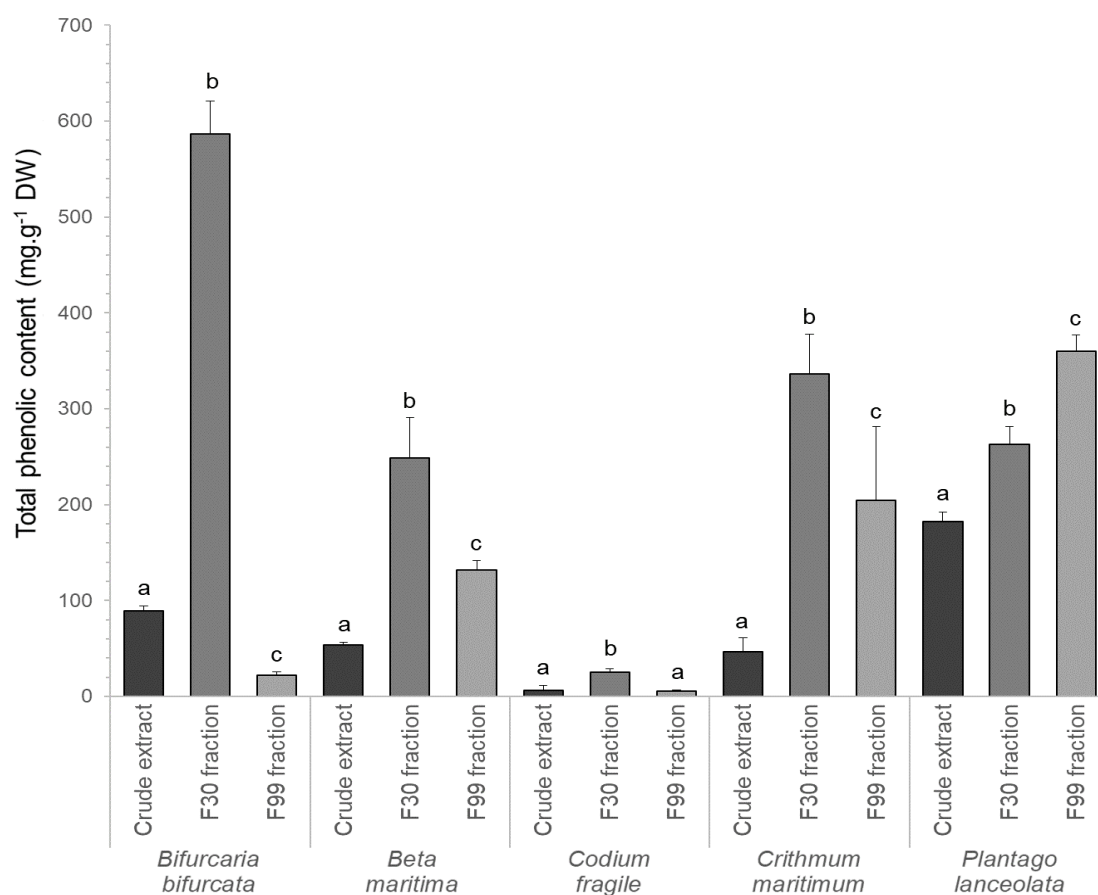
### 2.5. Results

#### 2.5.1. Crude extract and Diaion fractions

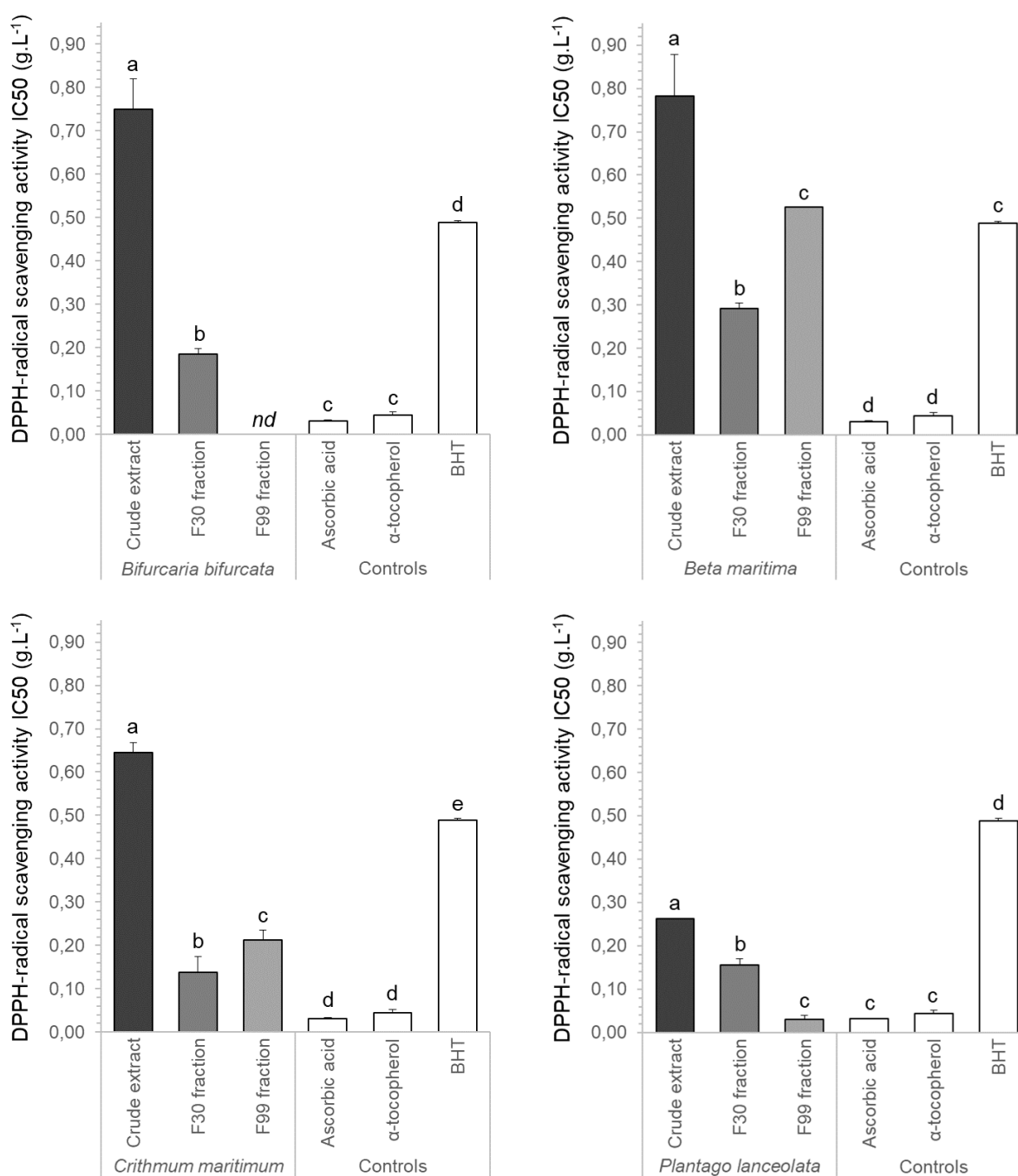
Quantification of phenolic compounds and radical scavenging activity

PC contents of the crude extracts and Diaion fractions varied differently in the studied species (**Figure IV.3**). The crude extracts from two species, *Plantago lanceolata* and *Bifurcaria bifurcata*, displayed highest PC contents with  $182.12 \pm 10.32 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$  and  $89.00 \pm 5.17 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ , respectively. The crude extracts from the other green lineage species, *Beta maritima*, *Crithmum maritimum* and *Codium fragile* displayed lower contents of PC. The primary fractionation by Diaion HP-20 allowed a significant PC-enrichment for all species: with the highest enrichment for *B. bifurcata*, *B. maritima*, *C. fragile* and *C. maritimum* in the F30 fraction with an increase of respectively 6.6, 4.6, 4.1 and 7.3 times compared to their crude extracts. For *P. lanceolata*, PC were already highly concentrated in the crude extract and the enrichment in Diaion fractions was then less significant. For this species, PC were significantly more concentrated in the F99 fraction than in the F30, with an enrichment of respectively 1.98 and 1.44 times. The *B. bifurcata* F30 fraction was the most concentrated in PC with  $587.10 \pm 34.13 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ .

The radical scavenging activities were estimated through sample IC50 values (**Figure IV.4**). Following primary fractionation, a decrease in IC50 values was recorded, which reflected an increase in the radical scavenging activities. Moreover, a significant negative Pearson correlation ( $r = -0.76$ ,  $p < 0.01$ ) was found between PC contents and the IC50 values. The highest activity was observed for *P. lanceolata* F99 fraction with  $0.03 \pm 0.01$  g.L<sup>-1</sup>, which was similar to the two most active controls (ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol). F30 fractions of *C. maritimum*, *P. lanceolata* and *B. bifurcata* displayed respective IC50 values of  $0.14 \pm 0.04$ ,  $0.16 \pm 0.01$  and  $0.19 \pm 0.01$  g.L<sup>-1</sup>, which significantly exceeded the BHT activity. Four IC50 values could not be determined, respectively for the three *C. fragile* samples and the *B. bifurcata* F99 fraction ( $> 1$  g.L<sup>-1</sup>).



**Figure IV.3.** Total phenolic contents of crude extracts and Diaion fractions (F30 and F99) from five species of macroalgae and coastal plants. Values are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Different letters indicate significant differences between samples within species in phenolic content (One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test;  $p < 0.05$ )



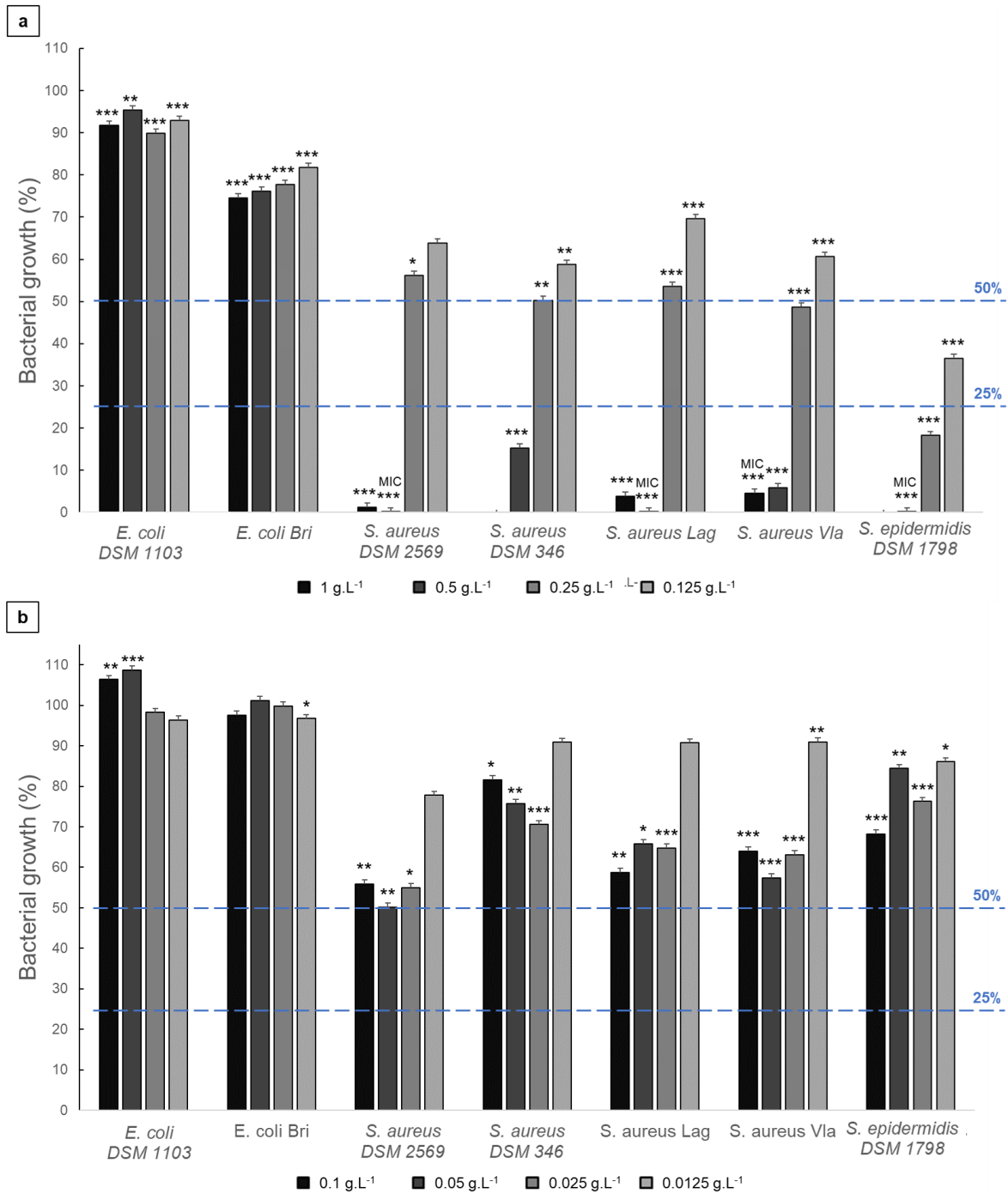
**Figure IV.4.** Radical scavenging activity (DPPH, IC<sub>50</sub>) of crude extracts and Diaion fractions (F30 and F99) from four species of macroalgae and coastal plants. Values are means ± SD (n = 3). Different letters indicate significant differences in radical scavenging activity (One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test; p < 0.05). BHT: Butylated hydroxytoluene. nd: not determined (IC<sub>50</sub> > 1 g.L<sup>-1</sup>)

### Antibacterial activity screening

Antibacterial activity tests were performed both on reference and clinical strains. Gentamicin was used as a positive control; as expected its MIC range were 0.5 - 1 mg.L<sup>-1</sup> for the *E. coli* strains, 0.25 - 0.5 mg.L<sup>-1</sup> for the *S. aureus* strains and 0.125 - 0.25 mg.L<sup>-1</sup> for the *S. epidermidis* strain (*data not shown*). A pre-screening of the antibacterial activities of the crude extracts and the Diaion fractions highlighted two Diaion fractions (*B. bifurcata* F30 and *P. lanceolata* F99) with promising antibacterial capacities on all staphylococcal strains (**Figure IV.5**).

The *B. bifurcata* F30 fraction (**Figure IV.5a**) led to strong inhibitory activities towards all tested staphylococcal strains (including clinical ones), with MIC range between 0.5 and 1 g.L<sup>-1</sup>. The *P. lanceolata* F99 fraction (**Figure IV.5b**) was assayed at lower concentrations as it was dissolved in DMSO and MIC could not be determined. It showed a significant growth inhibition activity of 40-50% on staphylococcal strains for concentrations below 0.1 g.L<sup>-1</sup>. However, when comparing the fractions at similar concentrations (*i.e.* 0.1 g.L<sup>-1</sup> for *P. lanceolata* F99 fraction and 0.125 g.L<sup>-1</sup> for *B. bifurcata* F30 fraction), the fractions presented a similar action on *S. aureus* strains with growth inhibitions of 35-45%. According to these results, staphylococcal strains (Gram-positive bacteria) were more sensitive to the tested fractions than the *E. coli* strains (Gram-negative bacteria). However, the antibacterial activities of the fractions were a thousand times lower than that of gentamicin.

At this stage, it was decided to exclude the *P. lanceolata* F99 fraction from the investigation because of its insolubility in water limiting its use and applications (despite its high radical scavenging and antibacterial activities). The study thus focused on the *B. bifurcata* F30 fraction only and aimed at purifying and characterizing its active molecules (*see further section*).

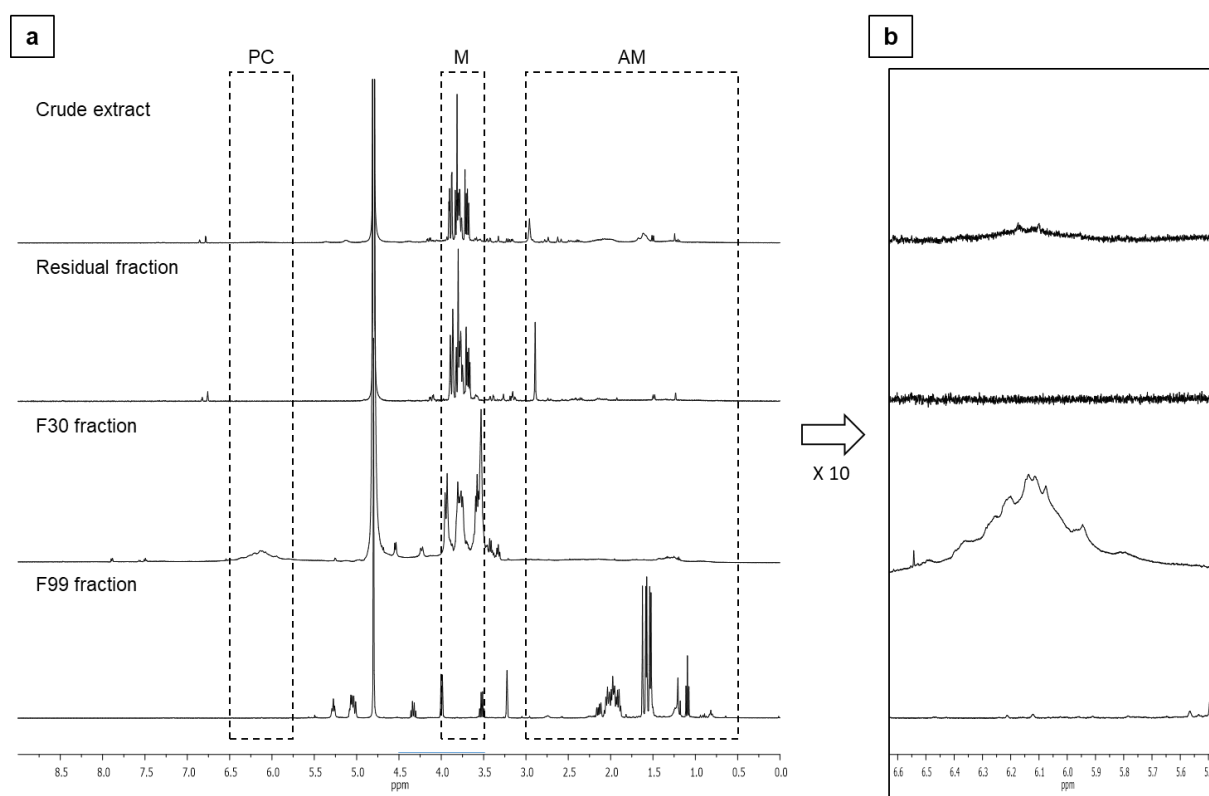


**Figure IV.5.** Effect of *Bifurcaria bifurcata* F30 fraction (a) and *Plantago lanceolata* F99 fraction (b) on bacterial growth compared to the control without inhibitor (100% growth) (n = 6, mean ± SD). \* indicate values significantly different from the control values (One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001). The dotted horizontal lines represent 25% and 50% of bacterial growth without inhibitor. *E. coli*: *Escherichia coli*, *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis* and MIC: Minimum inhibitory concentration



<sup>1</sup>H-NMR of *B. bifurcata* crude extract and Diaion fractions

<sup>1</sup>H-NMR analyses were performed to characterize the composition of *B. bifurcata* crude extract and Diaion fractions (**Figure IV.6**). The spectrum of the *B. bifurcata* crude extract displayed a multitude of peaks in the region 3.5 - 4 ppm that corresponds to mannitol (**Figure IV.6a**). These dominant peaks may have partially hidden other signals such as apolar compounds (0.5 - 3 ppm), and aromatic compounds (5.7 - 6.5 ppm). Although PC were present in the background, they were not discernible even when extending the signal. The residual fraction spectrum was used to visualize the non-adsorbed compounds, which were mainly mannitol. No signal was obtained in the aromatic compounds area for the residual fraction. The <sup>1</sup>H-NMR spectra confirmed results of the Folin-Ciocalteu assay as the PC were more abundant in the F30 fraction, as a signal with multiple peaks that stood out from the background noise. In this fraction, other signals were visible for mannitol and apolar molecules (**Figure IV.6b**). The presence of these other signals did not allow the characterization of the PC at this purification stage. The *B. bifurcata* F99 fraction contained mostly apolar compounds desorbed by absolute ethanol (**Figure IV.6a**). The primary fractionation by Diaion HP-20 allowed to obtain a *B. bifurcata* F30 fraction enriched in PC and depleted in mannitol, which may have interfered with the PC biological activities.



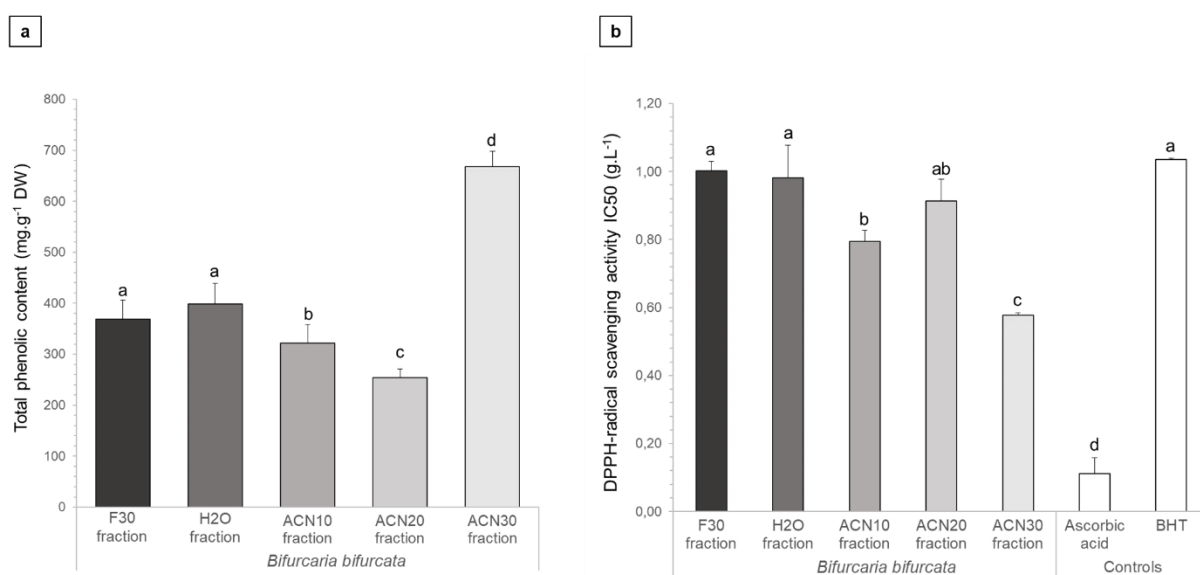
**Figure IV.6.** <sup>1</sup>H-NMR spectra of *Bifurcaria bifurcata* crude extract, residual fraction and Diaion fractions (F30 and F99) (a) and focusing on the aromatic compounds area (b). PC: Phenolic compounds, M: mannitol, and AM: apolar molecules

### 2.5.2. Purified fractions

In order to obtain sufficient material, a new batch of *B. bifurcata* F30 fraction was produced. After 1-year dry storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ , the bioactivities of this fraction were controlled and validated by the Folin-Ciocalteu, DPPH and antibacterial assays. The new F30 fraction had a lower PC content than the previous one with  $368.60 \pm 37.40 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$  (compared to the  $587.10 \pm 34.13 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$  previously obtained) and an  $\text{IC}_{50}$  value divided by a factor of 5.3 reflecting a loss of integrity during the storage. However, its antibacterial activity was conserved.

#### Quantification of PC and radical scavenging activity

The active *B. bifurcata* F30 fraction was purified using FC procedure in order to further concentrate and characterize its PC. FC purification yielded four fractions H2O, ACN10, ACN20 and ACN30 (**Figure IV.7**). Only the ACN30 fraction was significantly enriched in PC (1.8-fold to reach  $667.8 \pm 29.9 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) compared to the F30 fraction with a significant increase in associated radical scavenging activity (1.7-fold) that exceeded the BHT activity.



**Figure IV.7.** Total phenolic content (a) and their associated radical scavenging activity (b) in *Bifurcaria bifurcata* F30 fraction and FC fractions (H2O, ACN10, ACN20 and ACN30). Values are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Different letters indicate significant differences between the samples in total phenolic content and  $\text{IC}_{50}$  values (One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test;  $p < 0.05$ ). BHT: Butylated hydroxytoluene

## Antibacterial activity

The antibacterial activities of the different fractions were evaluated on three reference strains: *E. coli* DSM 1103, *S. aureus* DSM 2569, and *S. epidermidis* DSM 1798 (**Table IV.1**). As expected from our previous results (see **Figure IV.5**), no antibacterial activity was observed on the *E. coli* strain. All the FC fractions tended to promote *E. coli* growth under the tested conditions. On the contrary, all samples exhibited MIC or MBC on the tested staphylococcal strains. The F30 fraction had MIC at 0.5 g.L<sup>-1</sup> for both strains. The H2O fraction showed MBC at 1 g.L<sup>-1</sup> for *S. aureus*, MIC range of 0.5 - 1 g.L<sup>-1</sup> for both Gram-positive strains and high inhibitions at the lowest concentrations (almost 90%) with bacterial growth of 13.97 ± 3.96% for *S. aureus* and 12.57 ± 11.04% for *S. epidermidis*. The ACN10 fraction displayed a strong bacterial growth inhibition at 0.5 g.L<sup>-1</sup> with a MBC against *S. aureus* and a MIC against *S. epidermidis*, however, the inhibitory effect was declining for the lowest concentrations with bacterial growth around 50% with 0.25 g.L<sup>-1</sup> and around 65% with 0.0125 g.L<sup>-1</sup>. The ACN20 fraction showed a MBC only for *S. aureus* but its inhibition was higher than 80% for *S. epidermidis* at 0.5 and 1 g.L<sup>-1</sup> with respective bacterial growth of 17.95 ± 9.34% and 13.36 ± 7.29%. The last fraction, ACN30, showed a MBC against *S. epidermidis* at 1 g.L<sup>-1</sup> and a MIC at 0.5 g.L<sup>-1</sup> as well as a MIC at 1 g.L<sup>-1</sup> against *S. aureus*. The purification allowed to obtain active fractions against the tested Gram-positive strains with an increase of the antibacterial activity at the lowest concentrations compared to the F30 fraction, mainly for the H2O and ACN30 fractions.

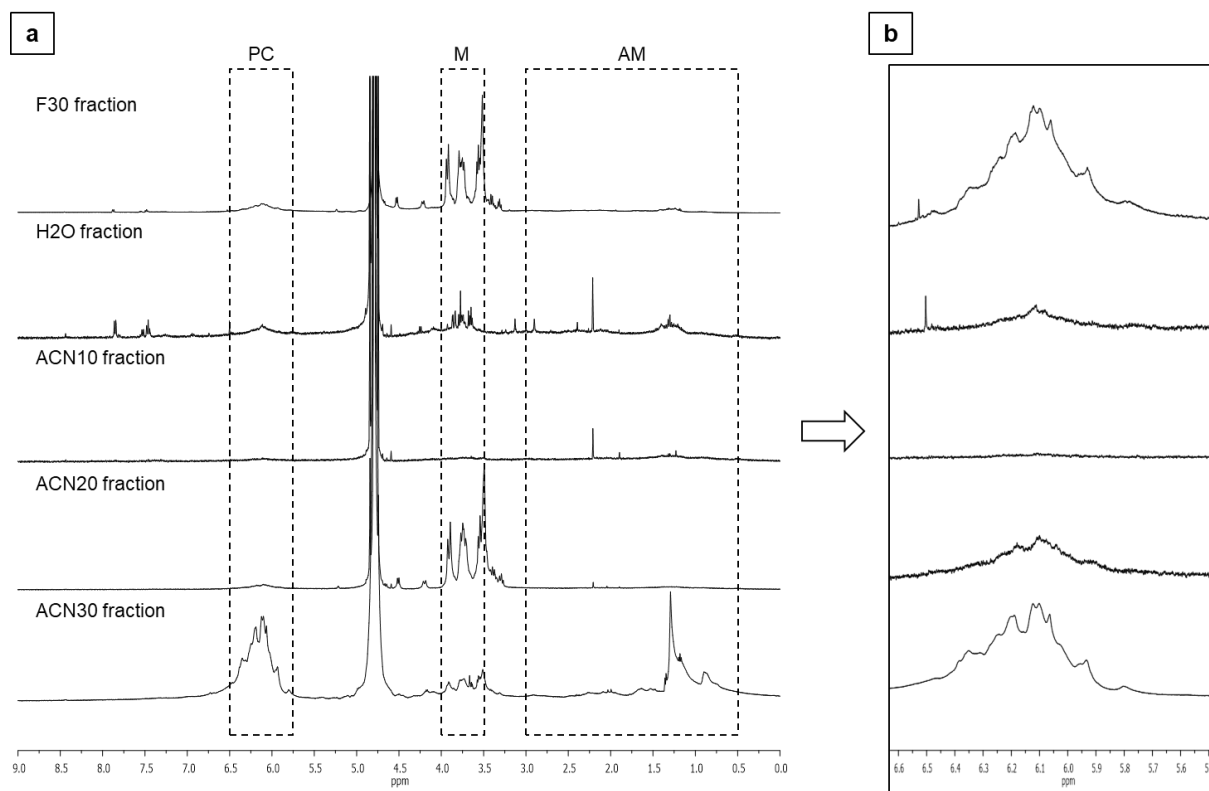
**Table IV.1.** Effect of *Bifurcaria bifurcata* F30 fraction and FC fractions (H2O, ACN10, ACN20 and ACN30) on bacterial growth compared to the control without inhibitor (100% growth) (n = 6, mean ± SD). \* indicate values significantly different from the control values (One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001). Bold values indicate extracts causing high growth inhibition, i.e. bacterial growth below 20%. *E. coli*: *Escherichia coli*, *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis*, MIC: Minimum inhibitory concentration and MBC: minimum bactericidal concentration.

<i>B. bifurcata</i> fractions	Concentration (g.L <sup>-1</sup> )	Bacterial growth (%)		
		<i>E. coli</i> DSM 1103	<i>S. aureus</i> DSM 2569	<i>S. epidermidis</i> DSM 1798
F30 fraction	1	91.77 ± 7.02	-	-
	0.5	95.35 ± 5.91	<b>MIC ***</b>	<b>MIC ***</b>
	0.25	89.91 ± 5.35 ***	56.22 ± 16.22 ***	<b>18.22 ± 18.46 ***</b>
	0.125	92.97 ± 5.86	63.82 ± 9.45 ***	36.50 ± 9.85 ***
H2O fraction	1	159.93 ± 7.93 ***	<b>MBC ***</b>	<b>MIC ***</b>
	0.5	153.49 ± 10.13 ***	<b>MIC ***</b>	<b>17.73 ± 6.58 ***</b>
	0.25	171.94 ± 11.85 ***	33.26 ± 4.01 ***	<b>14.77 ± 8.25 ***</b>
	0.125	142.47 ± 11.30 ***	<b>13.97 ± 3.96 ***</b>	<b>12.57 ± 11.04 ***</b>
ACN10 fraction	1	152.42 ± 19.16 ***	-	-
	0.5	126.33 ± 13.05 ***	<b>MBC ***</b>	<b>MIC ***</b>
	0.25	109.21 ± 7.65	46.07 ± 4.21 ***	54.88 ± 4.01 ***
	0.125	106.48 ± 7.25	66.67 ± 7.45 ***	62.87 ± 9.24 ***
ACN20 fraction	1	155.07 ± 11.11 ***	<b>MBC ***</b>	<b>13.36 ± 7.29 ***</b>
	0.5	141.89 ± 8.24 ***	24.22 ± 13.11 ***	<b>17.95 ± 9.34 ***</b>
	0.25	136.94 ± 13.85 ***	39.86 ± 9.08 ***	48.16 ± 19.82 ***
	0.125	120.66 ± 9.23 ***	94.52 ± 22.03	54.65 ± 8.42 ***
ACN30 fraction	1	105.10 ± 22.40	<b>MIC ***</b>	<b>MBC ***</b>
	0.5	130.57 ± 4.32 *	<b>10.08 ± 13.75 ***</b>	<b>MIC ***</b>
	0.25	131.20 ± 6.68 *	<b>6.85 ± 13.04 ***</b>	26.84 ± 14.85 ***
	0.125	142.94 ± 8.99 ***	61.89 ± 22.30 ***	44.32 ± 11.18 ***

#### <sup>1</sup>H-NMR of purified fractions

The four *B. bifurcata* FC fractions were analyzed by <sup>1</sup>H-NMR (Figure IV.8). As explained previously, the F30 fraction spectrum showed the presence of PC with several no discernible peaks between 5.7 and 6.5 ppm, as well as signals from mannitol and apolar molecules. The PC could not be identified due to the presence of strong polyol signals. The purification steps allowed the separation of these compounds in the different fractions. The H2O and ACN20 fractions showed high signals in the mannitol area and attenuated signals in the aromatic compounds area with unidentifiable peaks. The ACN10 fraction presented few peaks with low intensities that were mixed with the background in the mannitol and the apolar compounds areas, making the spectrum not usable for characterization. The spectrum of the ACN30 fraction was the one that allowed the most complete analysis. Indeed, the

mannitol peaks were reduced compared to the previous spectra, so the peaks of PC stand out. The PC profile of the ACN30 fraction was similar to that of the F30 fraction. In order to characterize the PC present in the active purified ACN30 fraction, a two-dimensional NMR analysis could be performed (see below section).

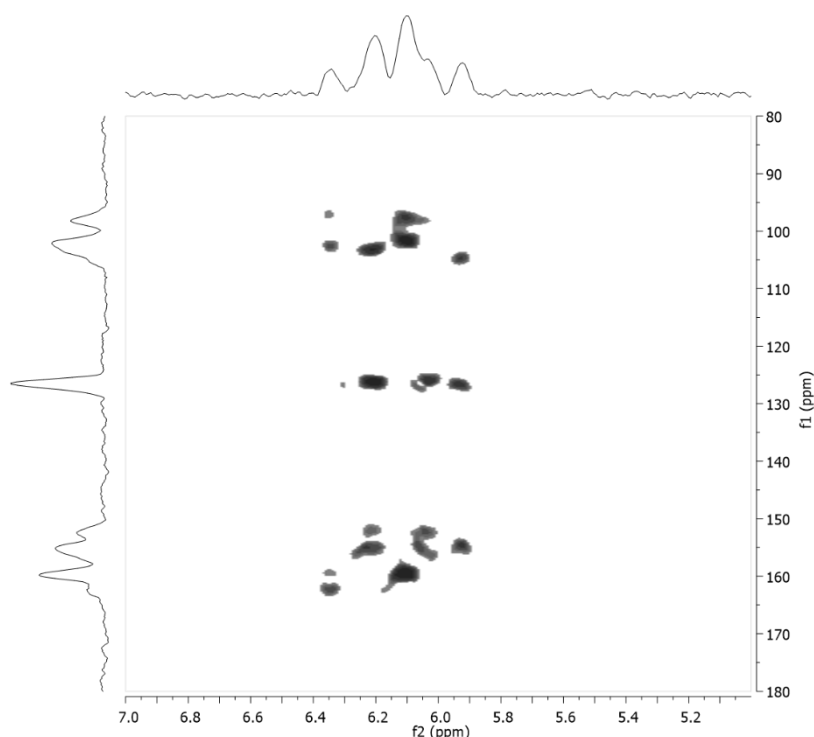


**Figure IV.8.**  $^1\text{H}$ -NMR spectra of the *Bifurcaria bifurcata* F30 and FC fractions (H<sub>2</sub>O, ACN10, ACN20 and ACN30) (a) and focusing on the aromatic compounds area (zoom adjusted by spectrum) (b). PC: Phenolic compounds, M: mannitol, and AM: apolar molecules

#### HMBC analysis of the *B. bifurcata* ACN30 fraction

The HMBC spectrum of the purified *B. bifurcata* ACN30 fraction confirmed the presence of polyphenolic structures (**Figure IV.9**). The chemical shifts observed for the  $^{13}\text{C}$  signals displayed four characteristic resonance zones. The regions of methine substituents on quaternary carbons at 97.5 ppm, aryl-aryl bonds between carbons involved in bonds between phloroglucinol units at 100.2 - 104.6 ppm, aryl-ether bonds between phloroglucinol units at 125 - 128.4 ppm, as well as phenolic carbons at 151 - 163.5 ppm. Thus, the presence of aryl-aryl bonds (characteristic of fucols) and aryl-ether bonds (characteristic of phlorethols) indicated the presence of a polymer of fucophlorethols, a class of phlorotannins. Moreover, no signal was obtained between 142 - 150 ppm indicating the absence of additional hydroxyl functions to the 1,3,5 OH originally present in the

phloroglucinol unit and thus the absence of fuhalol. Finally, no signal at 140 ppm indicated the absence of double aryl-ether linkages that could link two eckols subunits and thus the absence of this class of phlorotannins.



**Figure IV.9.** HMBC assignments of the purified *Bifurcaria bifurcata* ACN30 fraction

## 2.6. Discussion

The aim of this study was to isolate and purify new valuable antibacterial molecules from marine renewable resources (macroalgae and coastal plants) using eco-friendly green chemistry techniques for a sustainable approach. The active target molecules were the PC as they are known for their high diversity of bioactivities (Stiger-Pouvreau et al. 2014; Le Lann et al. 2016; Surget et al. 2017; Abu Khalaf et al. 2019; Gager et al. 2020, 2021). With the objective of the green chemistry procedure, PC were extracted by solid/liquid extraction with ethanol (crude extracts), partially fractionated by using a Diaion HP-20 resin (F30 and F99 fractions) and purified by Flash chromatography (H2O, ACN10, ACN20 and ACN30 fractions). The latter was performed only for the *Bifurcaria bifurcata* F30 fraction that showed the highest valuable potential.

Crude extract comparison between species

PC contents and free radical scavenging activities of the crude extracts showed disparities depending on macrophyte species. This extraction technique was favorable for *Plantago lanceolata*,

which had a higher PC content ( $182.12 \pm 10.32 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) compared to a previous study demonstrating lower PC content with extraction by infusion in water ( $1.37 \pm 0.05 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) (Ferrazzano et al. 2015). Studies focusing on *Plantago* spp. obtained lower PC contents by ranging from  $38.43 \pm 2.46$  to  $70.97 \pm 3.85 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$  after a 80% aqueous methanol extraction and use of petroleum ether (Beara et al. 2009), and between  $2.5 \pm 0.3$  and  $65.5 \pm 0.9 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$  with  $\text{CO}_2$  supercritical fluid, ultrasound-assisted or Soxhlet extractions (Mazzutti et al. 2017). *B. bifurcata* also exhibited one of the highest PC contents among the crude extracts ( $89.00 \pm 5.17 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ); however, the literature presents a wide range of PC contents for this species depending on the extraction technique. Alves et al. (2016) used absolute methanol and hexane to obtain a crude extract with higher PC content of  $220.01 \pm 0.01 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ . However, a recent study using absolute methanol and dichloromethane presented a crude extract with a lower PC content ( $10.63 \pm 1.40 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) after a May-June collection in Portugal (Silva et al. 2019). Agregán et al. (2018) extracted with 50% aqueous ethanol to obtain a crude extract with  $160 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$  which is closer to our result. Thus, the technique used in our study does not allow the total PC extraction of *B. bifurcata*. However, the PC content in the crude extract remained high, PC were bioactive and hydrophilic, and the solvent used was food grade, which was in accordance with the objective of sustainable procedure. In the case of *Codium fragile*, the 30% aqueous ethanol extraction yields low levels of PC ( $6.25 \pm 5.25 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) which is comparable to a previous study following 50% aqueous ethanol extraction ( $2.20 \pm 0.10 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) (Surget et al. 2017), so this species appears to be poorer in PC than the two previously presented species.

#### Effects of primary fractionation with Diaion HP-20 resin

The primary fractionation by Diaion HP-20 allowed the obtention of two ethanolic fractions, F30 and F99, from each crude extract. This step is key as it led to increase both the PC content and the radical scavenging power for all species. Diaion fractions enriched in PC (e.g. *B. bifurcata* F30 fraction and *P. lanceolata* F99 fraction) showed high radical scavenging activities, while those presenting a low PC content displayed a weak radical scavenging activity (e.g. *C. fragile* fractions) with a linear correlation as previously observed in other studies (Zubia et al. 2009; Gager et al. 2020). PC are well known to possess strong radical scavenging and antibacterial activities due to their chemical structure. Indeed, the presence of hydroxyl on aromatic rings gives them the possibility to exchange a hydrogen atom or an electron with the radical species, but also to delocalize an unpaired electron through their aromatic system (Beara et al. 2009; Dai and Mumper 2010; Sathya et al. 2017; Aminina et al. 2020). In our study, primary fractionation by Diaion was proven to be effective to concentrate bioactive PC by an eco-friendly process with a food grade solvent and a reusable matrix for various marine macrophytes, including for the first time the promising brown macroalga *B. bifurcata*.

As an example, the *B. bifurcata* F30 fraction displayed a PC content of  $587.10 \pm 34.13 \text{ mg.g}^{-1}$  DW, *i.e.* 58.71% of PC in the fraction against 8.90% in the crude extract (increase factor of 6.6). In a previous study, [Zubia et al. \(2009\)](#) were focused on the PC of this species, which were obtained by an accelerated solvent extraction (ASE) and a purification by solid phase extraction (SPE); the use of this procedure increased the PC content from 0.96% DW to 13.31% DW (increase factor of 13.9). Their purification efficiency was lower than that of our primary fractionation and the SPE technique was less eco-responsible by the use of methanol/dichloromethane mixture. Another study, following a protocol using 50% ethanol extraction and liquid/liquid purification, obtained variable PC contents for *B. bifurcata* of 150-350  $\text{mg.g}^{-1}$  DW depending on the collection year on the same site in autumn ([Gager et al. 2020](#)). Thus, our primary fractionation technique is favorable for PC purification of *B. bifurcata*. This process is innovative and will lead to the development of new eco-friendly protocols applicable to a wider variety of marine species than those more studied such as *Ecklonia cava* or *Macrocystis pyrifera* ([Kim et al. 2014](#); [Leyton et al. 2017](#)). Moreover, the chosen solvent allowed us to obtain hydrophilic molecules, which facilitate their use for the targeted applications in cosmetic, food and medical fields. Hydrophilic molecules can thus be incorporated into formulations without the toxic risk associated with the solvent, as would be the case for DMSO ([Awan et al. 2020](#); [Nguyen et al. 2020](#)).

#### Crude extracts and Diaion fractions screening for antibacterial activities

The antibacterial potential of each crude extract and Diaion fraction was tested on reference strains. The Gram-negative bacteria *Escherichia coli* DSM 1103 and the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* DSM 2569 were used as representatives of bacteria frequently involved in bone infections ([Bikels-Goshen et al. 2010](#); [Chihara and Segreti 2010](#); [Birt et al. 2017](#)). Only *B. bifurcata* F30 and *P. lanceolata* F99 fractions demonstrated significant antibacterial activities against *S. aureus*. These fractions were also tested on other Gram-positive reference (*S. aureus* DSM 346 and *Staphylococcus epidermidis* DSM 1798), and clinical (*E. coli* "Bri", and *S. aureus* "Lag" and "Vla") strains. The *B. bifurcata* F30 Diaion fraction showed MIC against almost all staphylococcal strains ranging between 0.5 - 1  $\text{g.L}^{-1}$ , which demonstrated a non strain-dependent inhibitory effect against Gram-positive bacteria. A slight significant inhibition appeared against *E. coli* strains. For the *P. lanceolata* F99 Diaion fraction, the analysis of its antibacterial activity was limited by its insolubility in water as it was tested at lower concentrations. Although inhibitions were observed against staphylococcal strains (up to 40-50% inhibition for some strains), no inhibitory effect was observed against *E. coli* strains. This can be explained by structural differences between the Gram-negative and the Gram-positive bacteria cell walls that implies a difference in sensitivity to PC ([Alves et al. 2016](#)). Indeed, Gram-negative bacteria have a cell wall impermeable to lipophilic solutes due to the presence



of an outer phospholipidic membrane rich in lipopolysaccharides. In addition, membrane porins are selective to hydrophilic solutes according to their size with a limit around 600 Da; moreover, periplasmic space contains enzymes capable of degrading non-bacterial molecules (Nostro et al. 2000; Horta et al. 2014). In contrast, the protection of Gram-positive bacteria is an outer layer of peptidoglycan that is neither a selective nor an impermeable barrier (Nostro et al. 2000). Both of these inhibitory Diaion fractions were a thousand times less efficient than gentamicin whose MIC corresponded to the literature (Bonnet et al. 2017). However, both fractions contained a mixture of molecules (see the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum on **Figure IV.6**) while gentamicin is an ultra-pure antibiotic with a broad-activity spectrum that impacts both Gram-negative and Gram-positive bacteria, which explains its use against bone infections (Knaepler 2012; Bonnet et al. 2017; Eltawila et al. 2021). PC often exhibit antibacterial activities by interacting with the cell membrane, which impact bacterial morphology or biofilm formation. PC can bind with the membrane proteins and intercalate into the membrane, which increases the permeability by disrupting the osmotic balance and causing the release of cellular compounds which reduces the resistance of the damaged cell (Ferrazzano et al. 2015; Shannon and Abu-Ghannam 2016; Efenberger-Szmechtyk et al. 2021). However, the presence of several molecules may have affected the inhibitory power of the PC due to a matrix effect, which may also explain the variabilities between the replicates, which was not the case with gentamicin (*data not shown*).

Based on our findings, only the water-soluble F30 Diaion fraction of *B. bifurcata* was selected to further the study. Indeed, this fraction contained a high PC content ( $587.10 \pm 34.13 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ ) with a high radical scavenging activity ( $\text{IC}_{50} \text{ value} = 0.19 \text{ g.L}^{-1}$ ) and an antibacterial activity against *staphylococcal* strains presenting MIC ranging between  $0.5 - 1 \text{ g.L}^{-1}$ . Moreover, *B. bifurcata* has already presented a richness in PC especially in autumn and several associated activities, *i.e.* radical scavenging, antioxidant and antitumoral activities (Zubia et al. 2009; Le Lann et al. 2012b; Gager et al. 2020, 2021).

#### $^1\text{H-NMR}$ characterization of the crude extract and Diaion fractions of *B. bifurcata*

The  $^1\text{H-NMR}$  spectra of these samples demonstrated the efficiency of the Diaion HP-20 resin in separating PC from other compounds. Mannitol was not adsorbed by the resin and mainly remained in the washing water as it is highly hydrophilic (Leyton et al. 2017). This molecule can reach 30% of the dry mass of *B. bifurcata* crude extracts (Connan et al. 2004). It was therefore important to remove it, in order to purify and concentrate the PC, which increased their radical scavenging and antibacterial activities.

### Purification by Flash chromatography

In order to further purify the F30 Diaion fraction of *B. bifurcata* and elucidate the PC structure, a purification by Flash chromatography was performed with a concentration gradient of acetonitrile (ACN). Only the ACN30 fraction was significantly PC-enriched and showed an increased radical scavenging activity. This fraction displayed an inhibitory activity against *S. aureus* and *S. epidermidis* even for the lowest concentrations with a significant growth inhibition around 40-55% at 0.125 g.L<sup>-1</sup>. MBC was observed at 1 g.L<sup>-1</sup> against *S. epidermidis*. The ACN30 fraction was analyzed by <sup>1</sup>H-NMR, and the spectrum confirmed the presence of PC with a clear signal and the sharp mannitol reduction, which allowed to carry out a 2D NMR analysis (HMBC). Two-dimensional analyses on <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts permitted to highlight that the PC present in the fraction belonged to the fucophlorethol class and that neither fuhalol nor eckol were present. The complexity of the signals showed the presence of a polycyclic polymer of phloroglucinol units. However, it will be necessary to pursue the work with mass spectrometry analysis in order to determine more precisely which polymers are present. To our knowledge, using different purification procedures, no fucophlorethol was previously found in *B. bifurcata* since only fucols, phlorethols, fuhalols and eckols have been identified in this Sargassecean species (Isaza Martínez and Torres Castañeda 2013; Stiger-Pouvreau et al. 2014; Agregán et al. 2017). However, this type of molecule is common in brown macroalgae such as *Fucus* spp. (Sandsdalen et al. 2003; Cérantola et al. 2006; Parys et al. 2010), *Ascophyllum nodosum* (Cérantola et al. 2006), *Himanthalia elongata* (Isaza Martínez and Torres Castañeda 2013) or *Cystoseira* spp., particularly, in *Gongolaria baccata* and *Gongolaria nodicaulis* (previously *Cystoseira baccata* and *Cystoseira nodicaulis*) (Stiger-Pouvreau et al. 2014; Jégou et al. 2021) with many associated activities such as antioxidant, anticancer and antibacterial activities as found in our study (Fernando et al. 2021). The highlighting of the antioxidant and antibacterial activities of this almost characterized fraction of *B. bifurcata* represents a valuable potential as a new preservative and antibacterial agent in the cosmetic, food and medical fields.

### 2.7. Conclusion

In conclusion, primary fractionation by Diaion HP-20 provided a first step in the purification of PC and proved to be efficient to semi-purify phenolic compounds from several marine macrophytes (macroalgae and coastal plants). A Diaion fraction from *Bifurcaria bifurcata* was enriched in PC with promising radical scavenging capacity and antibacterial activities against several staphylococcal strains. A purification by Flash chromatography allowed to obtain an active fraction (ACN30), which contained one or more polymers of the fucophlorethol class. This is the first time that fucophlorethol type molecules are found in *B. bifurcata*. This may be due to the purification technique, which used a

lower concentration of ethanol than other studies of the literature or to the use of the eco-friendly Diaion HP-20 resin. This study highlights the possible use of the Diaion resin to concentrate PC from a *B. bifurcata* extract and the protocol should be refined to improve the fractionation efficiency. However, it would be interesting to continue the characterization of the *B. bifurcata* fraction by mass spectrometry to know the precise structure of the molecules present in the final extract. It would also be necessary to study the possible toxicity of these elements in view of possible future applications in food, cosmetic or medical fields.

### Declarations of competing interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Authors' contribution

**Buscaglia M.:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - Original draft preparation and Writing - Review & Editing. **Le Blay G.:** Conceptualization, Methodology, Writing - Review & Editing, Supervision and Funding acquisition. **Fauchon M.:** Methodology, Investigation. **Gloanec N. :** Methodology, Investigation - Review & Editing. **Toueix Y.:** Methodology, Investigation. **Aulanier F.:** Methodology, Investigation. **Negri S.:** Methodology, Investigation. **Cérantola S.:** Methodology, Investigation. **Guerard F.:** Methodology, Writing - Review & Editing, Supervision and Funding acquisition. **Stiger-Pouvreau V.:** Methodology, Writing - Review & Editing, Supervision and Funding acquisition. **Hellio C.:** Methodology, Writing - Review & Editing, Supervision and Funding acquisition.

### Acknowledgments

This study was financially supported by the European Union through the INTERREG Atlantic Programme, under the scope of BLUEHUMAN (EAPA\_151/2016) project and by the Conseil Regional de Bretagne (PhD fellowship of M. Buscaglia). Antibacterial analyses and some chemical investigations were done on the Biodimar platform (LEMAR, UBO) which is supported by Biogenouest. We thank Pr. Geneviève Hery-Arnaud (INSERM UMR 1078) for providing the three clinical strains.

### References

All references are listed at the end of the manuscript to facilitate reading, see the references section on page 209.

### 3. ANALYSES COMPLEMENTAIRES

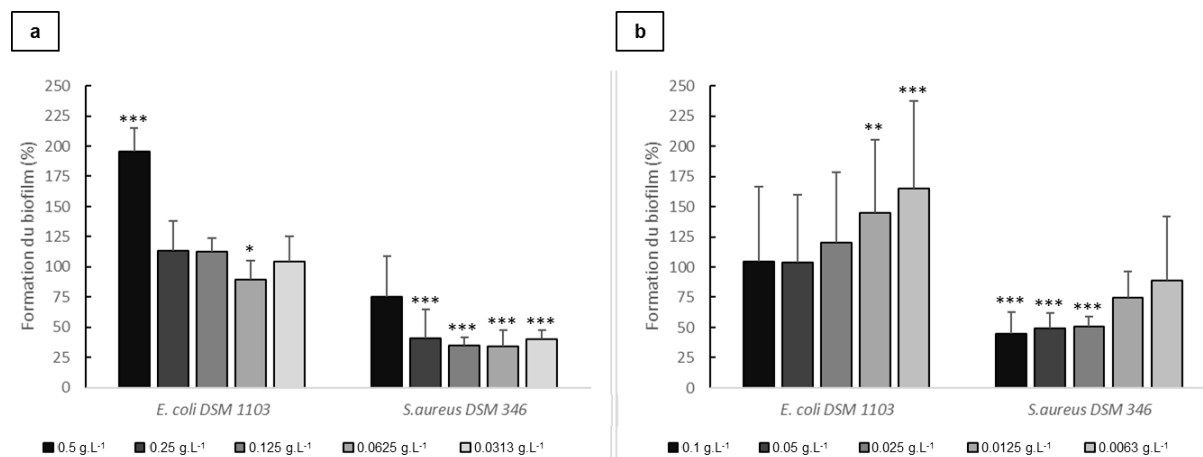
#### 3.1. Analyses de l'activité ostéogénique

L'analyse de l'activité ostéogénique a été réalisée par les partenaires BLUEHUMAN du Centre des Sciences Marines (CCMAR) à l'Université d'Algarve (Portugal) sur les extraits bruts et les fractions Diaion de *Bifurcaria bifurcata*, *Codium fragile* et *Plantago lanceolata* (voir protocole Chapitre III dans la partie « Materials and methods » page 128). Cependant, à la concentration testée ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), aucune activité n'a pu être détectée pour ces échantillons. La fraction F99 de *B. bifurcata* s'est révélée être toxique pour les larves de poissons zèbres. Des analyses sont en cours de réalisation sur les fractions de *B. bifurcata* suite à la purification par chromatographie Flash. Cette différence par rapport aux résultats du Chapitre III vient probablement du procédé de purification conduisant à une différence de composition du pool de molécules présentes dans les fractions testées.

#### 3.2. Analyses préliminaires de l'activité antibiofilm

Des tests préliminaires sur l'activité anti-biofilm des fractions F30 de *B. bifurcata* et F99 de *P. lanceolata* ont été réalisés sur deux souches productrices de biofilms, *Staphylococcus aureus* DSM 346 et *Escherichia coli* DSM 1103 par la méthode du cristal violet (ou Violet de gentiane) après optimisation au laboratoire (Santos et al. 2018). Brièvement, les souches ont été mises à incuber 4 - 5h à 37 °C dans du bouillon Tryptone Soja Broth (TSB) puis ont été repiquées sur gélose Tryptone Soy Agar (TSA) et incubées une nuit à 37 °C. Des colonies ont été mises en suspension dans du NaCl 0,85 % jusqu'à obtenir une concentration  $ca\ 1.10^8\ \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ , soit un indice de MacFarland de 0,5, par mesure de l'absorbance à 620nm. L'analyse a ensuite été réalisée en microplaque selon le même schéma que le test antibactérien par microdilution avec dépôt du milieu de culture, des échantillons ou de la gentamicine par dilution en série, et enfin, de l'inoculum. Des contrôles de formation de biofilm (inoculum sans inhibiteur), des contrôles négatifs (eau stérile sans inoculum) et des contrôles de couleur (échantillon sans inoculum) ont également été réalisés sur la microplaque. Par la suite, la plaque a été scellée et mise à incuber 24h à 37°C. Après l'incubation, les microplaques ont été inversées au-dessus d'un bac d'eau de javel. Les puits ont été lavés deux fois avec 100  $\mu\text{L}$  de NaCl 0,85% au goutte à goutte, afin de retirer les bactéries non adhérentes. Les microplaques ont été séchées au sèche-cheveux (à 40 cm de la microplaque, température ambiante, faible puissance) jusqu'à disparition des microgouttes. La formation de biofilm a été évaluée par l'ajout de 100  $\mu\text{L}$ /puits de cristal violet (0,1 %) (Grosseron) et une incubation de 10 min à température ambiante. Des lavages par immersion dans de l'eau distillée stérile ont été effectués jusqu'à ce que l'eau reste claire avant de

renverser les microplaques sur du papier absorbant et de les sécher à nouveau au sèche-cheveux. Le cristal violet lié au biofilm a été remis en suspension avec 100  $\mu\text{L}$ /puits d'acide acétique (33 %) sous agitation manuellement très légère. La  $\text{DO}_{620\text{nm}}$  a été mesurée (Sunrise, TECAN), les résultats de l'analyse sont présentés **Figure IV.10**.



**Figure IV.10.** Effet de la fraction F30 de *Bifurcaria bifurcata* (a) et de la fraction F99 de *Plantago lanceolata* (b) sur la formation du biofilm chez *Escherichia coli* DSM 1103 et *Staphylococcus aureus* DSM 346 comparé au contrôle sans inhibiteur (100% de formation) (n = 6, moyenne  $\pm$  SD). \* indique les valeurs significativement différentes de la valeur contrôle (One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001). *E. coli*: *Escherichia coli* et *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*.

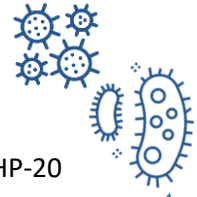
La fraction F30 de *B. bifurcata* a inhibé de 50 % la formation du biofilm chez *S. aureus* entre 0,0313 et 0,25 g.L<sup>-1</sup>, alors qu'elle a entraîné une activation de la production de biofilm chez *E. coli* à 0,5 g.L<sup>-1</sup> en comparaison au témoin. La fraction F99 de *P. lanceolata* a également permis d'obtenir 50% d'inhibition chez *S. aureus* aux trois plus fortes concentrations (0,025 g.L<sup>-1</sup> à 0,1 g.L<sup>-1</sup>) mais n'a permis aucune inhibition chez *E. coli* avec au contraire une observation de stimulation de la production de biofilm à 0,0063 g.L<sup>-1</sup> et 0,0125 g.L<sup>-1</sup>. Ainsi, *S. aureus* a été impactée par les deux fractions jusqu'à environ 50% de sa formation de biofilm. La gentamicine (2 mg.L<sup>-1</sup>) a totalement inhibé la formation de biofilms pour les deux souches (*résultats non montrés*). Cet antibiotique était donc plus efficace que les deux fractions actives testées, en effet, la gentamicine possède un large spectre d'activité, aussi bien, contre des bactéries à Gram-négatif qu'à Gram-positif, d'où son utilisation pour de infections telles que les ostéomyélites (Knaepler 2012; Bonnet et al. 2017; Eltawila et al. 2021). Pour la souche *E. coli*, la fraction F30 de *B. bifurcata* à 0,5 g.L<sup>-1</sup> a favorisé la production de biofilm et donc l'adhésion bactérienne. Une hypothèse est que les composés présents dans la fraction à forte concentration, se sont déposés au fond du puits, participant ainsi à la formation de biofilm et à l'intensité de coloration par le cristal violet. Une autre hypothèse serait que les bactéries utiliseraient les glucides présents dans la fraction afin de former du biofilm. En effet, en fonction de leur constitution et de leur concentration,

les composants chimiques des algues pourraient avoir un effet activateur ou inhibiteur sur le développement microbien (Creis 2015; Kulshreshtha et al. 2015). Les analyses sont à poursuivre avec un besoin d'optimisation de la méthode d'analyse afin de réduire les écart-types causés probablement par l'effet matriciel des échantillons et leur nature hétérogène, alors que ceux de la gentamicine, molécule pure, étaient plus faibles. Il faut également noter que le cristal violet est un colorant cationique qui se fixe sur l'ensemble des charges négatives du biofilm, celles-ci pouvant aussi bien être associées aux bactéries qu'à d'autres composés. Aussi, l'une des limites de l'utilisation des microplaques est qu'une partie du biofilm mesuré peut provenir de la sédimentation des bactéries, qui ont pu être enchâssées dans le biofilm (Tasse et al. 2017).

#### **4. CONCLUSION**

Dans ce chapitre, l'utilisation du protocole écoresponsable utilisant la résine Diaion HP-20 a permis de concentrer les composés phénoliques pour toutes les espèces étudiées (macroalgues et halophytes). Cependant, seule la fraction F30 de *B. bifurcata* a présenté des activités antiradicalaires et antibactériennes significatives contre les souches de staphylocoques, avec l'avantage d'être hydrosoluble, facilitant ainsi son utilisation future. Le fractionnement par chromatographie Flash a permis de caractériser les composés de cette fraction, des polymères de fucophloréthols, notamment, par le retrait de carbohydrates résiduels. A notre connaissance, c'est la première fois que ce type de composés bioactifs est retrouvé chez *B. bifurcata* mais il est encore nécessaire d'affiner la caractérisation, en l'occurrence l'obtention de la masse du/des composés, pour connaître la structure précise de la molécule. De plus, il est important de poursuivre l'étude par des analyses de cytotoxicité pour s'assurer de l'innocuité de la fraction avant d'envisager des applications en alimentation, cosmétique ou médecine en tant que conservateur ou antibactérien.

### A RETENIR



Le protocole écoresponsable basé sur l'utilisation de la résine Diaion HP-20 s'avère efficace pour concentrer les composés phénoliques pour les espèces de macroalgues et de plantes halophiles étudiées.

La fraction F30 de *Bifurcaria bifurcata* obtenue en suivant le protocole écoresponsable possédait un pouvoir antibactérien sur les souches de *Staphylococcus* spp. Le fractionnement par chromatographie Flash a permis de déterminer la présence de polymères de fucophloréthols actifs.

L'activité antibactérienne de la fraction F30 de *B. bifurcata* a été associée à une activité anti-biofilm (étude préliminaire).

Aucune activité ostéogénique n'a été observée dans ce Chapitre.

Les composés obtenus différent selon les protocoles utilisés, il est nécessaire de poursuivre les ajustements méthodologiques.









---

# **CHAPITRE V**

## **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

---

Le milieu marin est reconnu pour sa richesse en biomasses, animales, végétales et microbiennes, valorisables dans des domaines aussi variés que l'alimentation, les biomatériaux et le domaine médical (De Jesus Raposo et al. 2015; Al Khawli et al. 2019; Caruso et al. 2020; Ali et al. 2021; Zhou et al. 2021). Une protéine largement retrouvée dans les secteurs de l'alimentation, de la cosmétique ou encore de la santé, est le collagène ainsi que ses dérivés, la gélatine et ses peptides issus d'une hydrolyse chimique ou enzymatique. En tant que composant majeur de la matrice extracellulaire, cette protéine est biocompatible, biodégradable et biodisponible, et elle assure la résistance et la flexibilité tissulaire (Drury and Mooney 2003; Silvipriya et al. 2015; Elango et al. 2017; Bhagwat and Dandge 2018; Sundar et al. 2020). Par biomimétisme de la structure des tissus, l'ingénierie tissulaire s'intéresse aux composés naturels afin de développer des substituts médicaux pouvant réparer ou remplacer des tissus ou organes endommagés chez l'humain (Vats et al. 2003; Hollinger et al. 2004). Ainsi, le collagène est étudié pour son utilisation pour fabriquer divers matériaux comme les pansements, les substituts pour les vaisseaux sanguins, pour les nerfs, et également pour les tissus mous tels que la peau, ou encore, les tissus durs tels que les cartilages et les os (Barrère et al. 2008; Gu et al. 2019). Le collagène et ses dérivés utilisés pour ces applications proviennent généralement de mammifères terrestres tels que le porc et le bœuf mais cela est associé à une réticence du grand public par la crainte de possibles zoonoses, ainsi que, par les freins socio-culturels de certaines communautés (Jongjareonrak et al. 2006; Bae et al. 2008; Ferraro et al. 2010; Silvipriya et al. 2015; Bhagwat and Dandge 2018; Huang et al. 2019; Nitsuwat et al. 2021). Une source alternative est le collagène d'origine marine comme à titre d'exemple, celui de poisson (Chen et al. 2014; Chandika et al. 2015; Silvipriya et al. 2015; Lv et al. 2019; Subhan et al. 2020).

Ainsi, ces travaux de thèse se sont concentrés sur l'utilisation d'un collagène obtenu à partir de peaux de saumons atlantiques afin de répondre à un double objectif :

(1) Répondre à un besoin grandissant de collagène et de gélatine sans risque sanitaire ou frein socio-culturel à l'inverse des protéines de porcs et de bœufs (Jongjareonrak et al. 2006; Bae et al. 2008; Ferraro et al. 2010; Silvipriya et al. 2015; Bhagwat and Dandge 2018; Huang et al. 2019; Nitsuwat et al. 2021) ;

(2) Apporter une haute valeur ajoutée à un coproduit de l'industrie alimentaire, dont la quantité augmente suite à une demande croissante de saumon par les consommateurs, tout en garantissant la traçabilité et le respect de la chaîne du froid (Díaz-Calderón et al. 2017; FAO 2020).

Cependant, un obstacle important concerne les faibles propriétés mécaniques des collagènes marins, partiellement incompatibles avec des applications en ingénierie tissulaire notamment osseuse, qui sont la cible de mes travaux de thèse (Gómez-Guillén et al. 2002; Gómez-Estaca et al. 2009; Bode et al. 2011; Da Silva et al. 2014; Huang et al. 2019; Subhan et al. 2020). Ce verrou technologique peut être

surmonté par un procédé de réticulation par voie enzymatique qui permet le développement du réseau interne améliorant ainsi la résistance du matériau, cependant, une optimisation est nécessaire pour chaque matériau développé (Folk 1970; Chen et al. 2005; Alves Macedo et al. 2010; Stachel et al. 2010; Cheng et al. 2019; Liu et al. 2020; Rico-Llanos et al. 2021).

Un autre obstacle a été mis en avant par rapport à la future utilisation possible du collagène car ce biomatériau doit être injecté sous forme d'hydrogel ou introduit dans la cavité osseuse sous forme d'éponge aux dimensions ajustées par intervention chirurgicale pouvant entraîner des infections tissulaires. Dans le cas d'une intervention chirurgicale, une antibiothérapie prophylactique est administrée et si une infection survient au niveau du site opératoire après la chirurgie, une antibiothérapie curative est proposée. Ces infections post-opératoires sont difficiles à traiter en raison des mécanismes de défense des bactéries tels que la formation de biofilm et leur capacité à développer des résistances mais également par la difficulté de trouver des antibiotiques à bonne pénétration osseuse (Chihara and Segreti 2010; Birt et al. 2017). Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont porté sur la recherche de nouvelles molécules aux propriétés antibactériennes et ostéogéniques afin d'améliorer la régénération tissulaire en limitant les risques d'infection. Cette recherche est nécessaire pour :

- (1) Elargir la gamme des molécules actives connues et susceptibles d'être utilisées dans le domaine médical pour contourner les antibiorésistances déjà développées par certaines souches bactériennes ;
- (2) Libérer des molécules antibactériennes sur le site de l'infection par l'association au biomatériau, afin de réduire la quantité d'antibiotiques administrée par voies orales ou intraveineuses.

Pour répondre à ces diverses problématiques, ce travail pluridisciplinaire a dans un premier temps porté sur le développement d'un biomatériau à base de collagène de saumon dont les propriétés ont été améliorées par réticulation enzymatique en comparaison à du collagène de porc, ainsi qu'à une réticulation chimique connue pour son efficacité (*Chapitre II de ce manuscrit*). Dans un second temps, ce travail a concerné la recherche de composés phénoliques bioactifs aux propriétés ostéogéniques et/ou antibactériennes provenant de végétaux marins (macroalgues et halophytes) en comparant deux méthodologies d'obtention des composés d'intérêt : une approche utilisant des procédés conventionnels et une autre utilisant des procédés plus écoresponsables (*Chapitres III et IV de ce manuscrit*). L'objectif à long terme serait de combiner les molécules actives d'intérêt à la matrice collagénique afin de produire un biomatériau fonctionnalisé pour la régénération osseuse.

Plusieurs problématiques ont été soulevées :

Dans le chapitre II :

- Est-il possible de modifier les propriétés physiques et structurales d'un collagène de saumon par réticulation enzymatique à l'aide de la transglutaminase microbienne (MTG) ?
- La réticulation enzymatique peut-elle concurrencer la réticulation chimique dans l'amélioration des propriétés mécaniques et structurales du collagène de saumon ?
- Le collagène de saumon est-il comparable au collagène de mammifère après réticulation ?
- Quels sont les paramètres de réticulation enzymatique optimaux pour obtenir un biomatériau à base de collagène de saumon pouvant aider à la régénération tissulaire osseuse ?

Dans les chapitres III et IV :

- Les végétaux sélectionnés peuvent-ils fournir des composés phénoliques présentant des activités ostéogéniques et/ou antibactériennes ?
- Les deux stratégies de purification permettent-elles d'obtenir des résultats comparables ?
- Le procédé plus écoresponsable peut-il concurrencer ou remplacer le procédé conventionnel ?
- La purification des composés phénoliques est-elle suffisante ?
- La caractérisation des composés phénoliques est-elle possible ?

Une synthèse des résultats marquants obtenus durant ce projet de recherche, ainsi que leurs limites et perspectives, sont présentées dans cette discussion générale.

### **1. DEVELOPPEMENT D'UN BIOMATERIAU RETICULE A BASE DE COLLAGENE DE SAUMON**

Le collagène marin présente des avantages comparables à ceux du collagène de mammifères terrestres comme une forte biocompatibilité, une dégradabilité intra-tissulaire par l'action d'enzymes produites par les ostéoclastes et une facilité d'extraction (Hollinger et al. 2004; Khurana et al. 2010; Chen et al. 2014; Silvipriya et al. 2015; Bhagwat and Dandge 2018; Huang et al. 2019; Lim et al. 2019; Subhan et al. 2020). Cependant, sa composition en acides aminés diffère légèrement de celle des mammifères terrestres, ce qui a un impact sur sa résistance mécanique et thermique, diminuant son champ d'applications, notamment en ingénierie tissulaire où ces paramètres sont cruciaux (Gómez-Guillén et al. 2002; Bode et al. 2011; Haug and Draget 2011; Subhan et al. 2020).

Ce travail a permis de développer un protocole améliorant la solidité de la structure tridimensionnelle de la matrice de collagène de saumon et augmentant ainsi sa résistance mécanique et thermique. Pour cela, plusieurs concentrations de transglutaminase microbienne (MTG) ont été appliquées aux

matrices, et les impacts ont été analysés par des tests biochimiques, rhéologiques et structuraux. Il en est ressorti que l'ajout de 2% de MTG (w/w de collagène) permettait d'améliorer faiblement la solidité du réseau interne, ce qui ne suffisait pas à conserver la cohésion du matériau à plus de 21°C, alors que les matériaux réticulés avec 5% et 10% de MTG (w/w de collagène) restaient cohésifs à plus de 40°C. Ces deux derniers prototypes étaient similaires en termes de résistance thermique, cependant, leur comportement, leur structure chimique et leur microstructure variaient. En effet, le matériau à 5% de MTG était souple et collant à 40°C, il présentait des pores d'un diamètre moyen d'environ 630 µm et d'après les données de spectrométrie FTIR, la quantité de triple hélices était élevée indiquant une cinétique de formation des liaisons covalentes permettant aux molécules de collagène de s'ordonner. Au contraire, le matériau réticulé avec 10% de MTG était plus rigide avec un module de conservation ( $G'$ ) élevé, non-collant à 40°C, ses pores étaient en moyenne plus petits (environ 460 µm) et sa structure présentait moins de triples hélices. En effet, les liaisons covalentes se formaient probablement plus vite, bloquant les molécules de collagène dans une conformation dépliée. Ainsi, à partir d'une même biomasse, nous avons pu obtenir deux types de biomatériaux, ce qui contribue à augmenter les champs d'applications possibles. Le matériau plus souple et collant pourrait être utilisé dans la fabrication de pansements ou de patches en cosmétique et en médecine. Le matériau plus rigide, quant à lui, est prometteur pour des applications pour des emballages alimentaires ou pour l'ingénierie tissulaire. Et notamment, pour des tissus tels que les cartilages ou les os par sa structure poreuse pouvant accueillir les cellules, ainsi que, sa rigidité et sa résistance thermique dépassant la température corporelle humaine. La capacité de réhydratation des différents matériaux permet de les stocker à sec afin de les préserver jusqu'à leur utilisation, mais également, de les réhydrater avec différentes solutions telles que du sérum physiologique pour améliorer le développement cellulaire, par exemple.

Dans cette partie, nous avons ainsi réussi à modifier et améliorer les propriétés physiques et structurelles du collagène de saumon par l'action de réticulation de la MTG dont les résultats sont comparables à ceux de la réticulation chimique par le glutaraldéhyde (GTA) mais sans apporter de résidus cytotoxiques. De plus, il a été montré que le collagène de saumon était une alternative prometteuse au collagène de porc car les résistances des matrices sont comparables. Il est toutefois nécessaire d'utiliser des concentrations d'enzymes plus importantes pour réticuler le collagène de saumon, mais une fois le seuil de 10% dépassé, la concentration en enzyme n'induit plus de différence quantifiables sur le plan rhéologique entre les collagènes. Ainsi, il semblerait que 10% de MTG soit suffisant pour obtenir un biomatériau candidat pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Cette étude ouvre des perspectives intéressantes pour la suite de l'étude de ce matériau pour ce champ d'application, cependant, des tests complémentaires seront nécessaires pour valider la conformité du matériau (*voir Section 5 de ce chapitre*).

## **2. COMPOSES PHENOLIQUES BIOACTIFS ISSUS DE VEGETAUX MARINS ET ISOLEES PAR UN PROCEDE D'EXTRACTION CONVENTIONNEL**

La recherche de molécules bioactives par procédé conventionnel a été menée sur quatre espèces de végétaux marins (*Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cladophora rupestris* et *Plantago lanceolata*) choisis pour leur capacité à fournir une grande diversité de métabolites secondaires. Les composés ciblés étaient les composés phénoliques reconnus pour leur diversité d'activités biologiques décrites dans la littérature scientifique : activités antioxydantes, antitumorales, anti-inflammatoires, antifouling, antifongiques, antibactériennes et antivirales (Zubia et al. 2009; Onofrejevá et al. 2010; Li et al. 2011; Rajauria et al. 2013; Desbois and Smith 2015; Heffernan et al. 2015; Le Lann et al. 2016; Cotas et al. 2020; Del Mondo et al. 2021; Jimenez-Lopez et al. 2021). Ces composés ont été extraits et purifiés en suivant un protocole conventionnel qui associe une macération à chaud avec de l'éthanol à 50% et une purification liquide/liquide avec des solvants aux polarités variables, afin de concentrer les composés phénoliques (Stiger-Pouvreau et al. 2014; Ar Gall et al. 2015; Surget et al. 2015; Gager et al. 2020; Jégou et al. 2021), dans un deuxième temps, une purification sur phase solide (SPE) a été ajoutée (Zubia et al. 2009). Les différentes fractions ont été analysées pour déterminer leur teneur en composés phénoliques, leurs activités antiradicalaires et ostéogéniques, ainsi que le pouvoir antibactérien (cette dernière étude étant préliminaire). Plusieurs fractions prometteuses ont été sélectionnées dès la phase de semi-purification, notamment les fractions acétate d'éthyle (EA) de *B. maritima*, *B. bifurcata* et *P. lanceolata*. En effet, ces trois fractions présentaient des activités antiradicalaires et ostéogéniques comparables à celles des molécules témoins. Leurs capacités ostéogéniques en font ainsi des candidates potentielles pour la régénération osseuse. De plus, les fractions EA de *B. maritima* et *B. bifurcata* ont montré une activité antibactérienne sur la souche *S. epidermidis* DSM 1798 (ATCC 12228), ce qui est un avantage considérable pour leur utilisation en association avec une matrice collagénique. L'étape de purification par SPE a permis d'augmenter l'activité antibactérienne des fractions de *B. maritima* et *B. bifurcata*, cependant, elle a entraîné la perte de leur activité ostéogénique. Ce fractionnement a néanmoins permis de déterminer que les fractions EA de *B. bifurcata* et *P. lanceolata* contenaient majoritairement des fuhalols et phlorethols pour *B. bifurcata* et du verbascoside pour *P. lanceolata*. Les fuhalols et phloréthols sont des familles de phlorotannins exclusifs aux algues brunes et ils présentent des activités anticancéreuses, antioxydantes, antibactériennes et photoprotectrices (Nakai et al. 2006; Li et al. 2011; Tanniou et al. 2014; Le Lann et al. 2016; Gonçalves et al. 2019; Malyarenko et al. 2020). Cependant, aucune étude n'a, à notre connaissance, mis en évidence leur activité ostéogénique. De même, le verbascoside, est un composé phénolique présent dans plus de 200 plantes terrestres, dont les espèces du genre *Plantago*, il est connu pour ses activités antioxydantes, anti-inflammatoires,

hépatoprotectrices, immunorégulatrices, neuroprotectrices, antigénotoxiques et ostéogéniques (Scarpati and Delle Monache 1963; Li et al. 2005; Harput et al. 2012; Alipieva et al. 2014; Wan et al. 2016; Deribew et al. 2018; Gonçalves et al. 2019; Gong et al. 2019; Henn et al. 2019; Yang et al. 2019). Ainsi, il est possible qu'une synergie entre les molécules caractérisées et d'autres molécules présentes dans les fractions EA de chaque espèce soit à l'origine de l'activité ostéogénique. Une autre hypothèse, serait que la purification par SPE a modifié la conformation des molécules, annulant leur activité, mais notre étude ne nous permet pas de le dire.

Ces résultats sont prometteurs mais il sera nécessaire de mener des études complémentaires pour s'assurer de la biocompatibilité de ces fractions enrichies en composés phénoliques bioactifs en testant, notamment, leur cytotoxicité sur des lignées cellulaires humaines, ainsi que leur capacité minéralogénique pour renforcer les os fragilisés (voir Section 5 de ce chapitre). La structure précise des composés de *B. maritima* et *B. bifurcata* reste encore à élucider par spectrométrie de masse notamment, mais l'analyse de telles structures s'avère complexe.

### **3. COMPOSES PHENOLIQUES BIOACTIFS ISSUS DE VEGETAUX MARINS ET ISOLES PAR UN PROCEDE D'EXTRACTION ECORESPONSABLE**

Cette partie avait pour objectif de tester un protocole d'extraction et de purification de composés phénoliques plus écoresponsable que le précédent, en utilisant une résine Diaion HP-20 réutilisable, ainsi que de l'éthanol 30% et 99% comme seuls solvants (Tanniou et al. 2013). La résine Diaion HP-20 a déjà été utilisée pour purifier les composés phénoliques notamment pour des végétaux supérieurs et quelques algues brunes (Kim et al. 2014; Leyton et al. 2017; Mitani et al. 2018; Sun et al. 2018; Koshi et al. 2019; Hanh et al. 2020). Dans notre étude, la résine Diaion a permis d'enrichir, par des facteurs d'environ 2 à 7, les teneurs en composés phénoliques des échantillons de toutes les espèces : *Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata*, *Codium fragile*, *Crithmum maritimum* et *Plantago lanceolata*. La fraction la plus prometteuse provenait de *B. bifurcata* (fraction F30) et présentait une forte activité antiradicalaire, ainsi qu'une activité antibactérienne sur les différentes souches de staphylocoques testées. Le fractionnement par chromatographie Flash selon un gradient d'acétonitrile a permis d'analyser la composition de la fraction F30 par le retrait du mannitol résiduel qui empêchait préalablement sa caractérisation. La fraction ACN30 issue de la chromatographie était enrichie en composés phénoliques et présentait des capacités antibactériennes similaires à celles observées dans la fraction F30. En analysant la fraction ACN30, nous avons montré que les composés actifs étaient majoritairement des fucophloréthols. Cependant, les résultats de cette partie ne montraient aucune activité ostéogénique dans les différentes fractions testées.



Les résultats permettent ainsi de conclure que les composés phénoliques obtenus par les deux méthodologies, conventionnelle et écoresponsable, ne sont pas les mêmes et que leurs activités divergent. En effet, par l'extraction réalisée avec de l'éthanol 30% au lieu de 50%, un pool de composés phénoliques différents a été extrait. Le choix de l'éthanol 30% ayant été fait pour privilégier l'extraction de molécules hydrophiles pour faciliter leur utilisation par la suite. Les composés antibactériens de la fraction F30 de *B. bifurcata* sont donc prometteurs pour une application dans le domaine biomédical, cependant, il est encore nécessaire d'approfondir leur caractérisation en étudiant leur spectre d'activité sur un large panel d'espèces bactériennes, leur mode d'action et leur cytotoxicité, ainsi qu'améliorer leur caractérisation moléculaire comme évoqué dans la partie précédente (*voir Section 5 de ce chapitre*). Ces deux parties ont permis de répondre aux problématiques exposées précédemment car nous avons obtenu des fractions enrichies en composés phénoliques bioactifs à partir de plusieurs espèces sélectionnées. Les fractions de *B. bifurcata* étaient les plus prometteuses pour les deux protocoles avec des composés différents et valorisables en tant que molécules ostéogéniques et antibactériennes. La purification par les deux méthodes est bonne mais ne permet pas la caractérisation précise des composés dans le cas des macroalgues par manque de maîtrise actuelle pour l'identification de ces molécules complexes. Les deux stratégies de purification ont donné des résultats différents mais il faudrait perfectionner la technique par Diaion HP-20 afin de mieux maîtriser la purification, en diversifiant dans un premier temps les pourcentages d'éthanol utilisés pour l'extraction, puis dans un second temps, en soumettant les composés fixés sur la résine à un gradient de concentration d'élution avec l'éthanol pour affiner la séparation et retirer, potentiellement, l'étape de chromatographie Flash. Ces ajustements pourraient ainsi permettre l'obtention des composés de la méthode conventionnelle. Ainsi, le procédé plus écoresponsable est prometteur pour purifier les composés phénoliques. Ce procédé présente l'avantage d'être transposable à grande échelle plus facilement que le procédé conventionnel nécessitant de grandes quantités de solvants organiques toxiques. En effet, le protocole Diaion a été réalisé en batch avec des étapes de filtration et lavages qui peuvent être réalisées dans des cuves de production industrielle.

#### **4. FONCTIONNALISATION DU BIOMATERIAU COLLAGENIQUE AVEC LES COMPOSES PHENOLIQUES BIOACTIFS**

L'objectif à long terme de mes travaux de thèse sera de fonctionnaliser le biomatériau collagénique par l'ajout des composés phénoliques des différentes espèces analysées, cette combinaison serait novatrice pour développer une matrice tridimensionnelle qui serait à la fois une charpente pour les cellules régénératrices ainsi qu'un stimulant pour ces cellules, tout en limitant les infections bactériennes. Pour cela, il est envisageable de réhydrater les matrices réticulées dans un liquide physiologique contenant les composés phénoliques pour que ces derniers viennent se fixer sur

les fibres de collagène par diffusion du liquide. Les composés phénoliques ont une affinité pour les protéines telles que le collagène et interagissent via des liaisons hydrophobes pour agréger les protéines tout en dépliant leurs structures globulaires (Bello et al. 2020; Kaczmarek and Mazur 2020; Zhao et al. 2020; El Moujahed et al. 2022). Une étude récente sur la fixation du phloroglucinol (précurseur des phlorotannins) à des fibres de collagène de type I a montré une fixation résistant aux lavages et une amélioration du développement de cellules semblables à des fibroblastes et à des ostéoblastes (Mieszkowska et al. 2020). Des travaux, portant sur le développement de membranes adhésives pour l'ingénierie des tissus mous, ont démontré le potentiel de combiner du collagène de peaux de *Gadus morhua* (la morue de l'Atlantique) à du chitosan et du catechol, ce qui améliore les propriétés adhésives et mécaniques du matériau, tout en aidant à la fixation et à la prolifération de fibroblastes (Correia et al. 2022). Les composés phénoliques pouvant impacter les structures du collagène et de la gélatine par des réactions de réticulation (Jus et al. 2011; Zhao et al. 2020; El Moujahed et al. 2022), il serait préférable de les intégrer dans la matrice après réticulation enzymatique et d'analyser la fixation par des techniques telles que la spectrométrie FTIR et la RMN. De plus, il sera nécessaire de vérifier la conservation des activités des composés phénoliques une fois combinés et immobilisés dans la matrice. Ainsi, une fois le biomatériau mis en place, les cellules osseuses pourraient alors réaliser le cycle de renouvellement tissulaire en dégradant la matrice en étant stimulées par les composés phénoliques, la régénération serait ainsi accélérée tout comme le rétablissement du patient.

##### **5. LES PERSPECTIVES OUVERTES PAR CE TRAVAIL DE THESE**

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans des enjeux actuels, tout d'abord, écologiques et économiques en apportant une haute valeur ajoutée à une biomasse peu valorisée (peau de saumon) mais également sanitaires en offrant la possibilité de soigner des traumatismes osseux avec un matériau biocompatible, disponible en grande quantité, peu coûteux et accepté par toutes les communautés notamment par la bonne image qu'offre pour le moment les produits issus du monde marin. Les composés phénoliques s'intègrent également dans ces enjeux, cependant, en terme d'impact écologique, le prélèvement de la biomasse pourrait impacter le milieu. En effet, les rendements massiques des quatre fractions les plus prometteuses par rapport à la masse sèche d'origine sont peu élevés.

Les rendements obtenus au niveau des fractions finales sont :

Fractions EA (Chapitre III) : *B. maritima* à 0,37%, *B. bifurcata* à 0,33% et *P. lanceolata* à 0,45%.

Fraction F30 (Chapitre IV) : *B. bifurcata* à 2,4%.

A la suite de ces travaux, plusieurs analyses restent à faire. Les biomatériaux à base de collagène développés dans ce travail de thèse doivent encore être évalués (*i.e.* études complémentaires de leurs propriétés mécaniques, de leur capacité à être colonisés par des cellules, de leur fonctionnalisation ...) avant d'envisager leur utilisation comme biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire osseuse. En effet, les biomatériaux devront passer plusieurs tests mécaniques tels que les tests de résistance à la compression et à la traction car une fois implantés, ils seront soumis aux mêmes efforts mécaniques que les os. Si l'effet de la réticulation sur ces caractéristiques s'avérait insuffisant, on pourrait envisager de combiner les matrices de collagène avec d'autres matériaux tels que l'hydroxyapatite, le minéral naturel principal de la matrice osseuse (Liu et al. 2009; Xia et al. 2013; Diogo et al. 2018; Kołodziejska et al. 2020). Il est également possible d'envisager d'utiliser les matrices pour combler les lacunes osseuses et d'immobiliser l'os avec un plâtre, ainsi, le matériau n'aura pas à supporter de fortes contraintes mais pourra stimuler la régénération osseuse. En parallèle, il faudra vérifier la compatibilité cellulaire des matrices. Le collagène et la gélatine sont des matériaux biocompatibles par la conservation génétique associée (Vuorio and De Crombrughe 1990; Drury and Mooney 2003; Silvipriya et al. 2015; Elango et al. 2017; Bhagwat and Dandge 2018; Haq et al. 2019; Sundar et al. 2020), cependant, il sera nécessaire de vérifier que les modifications apportées par la réticulation ou l'ajout d'un autre matériau n'ont pas impactées cette propriété. Pour cela, des tests cellulaires seront menés avec des cellules souches osseuses afin d'évaluer leurs capacités de survie, d'adhésion, de différenciation, de prolifération, ainsi que leur capacité à utiliser le matériau pour néo-former de l'os. La dégradation du biomatériau pourra également être observée *in vitro* en le mettant en contact avec des enzymes de type collagénases ou par mises en contact avec des ostéoclastes pour valider son potentiel de biodégradabilité (Ng et al. 2020; Kołodziejska et al. 2020). Une fois les analyses complémentaires réalisées, le biomatériau développé dans cette thèse pourra intégrer les substituts osseux potentiels et être utilisé préalablementensemencé ou non. Sur le marché en expansion des substituts osseux, plusieurs entreprises s'intéressent au développement de substituts notamment pour des défauts parodontaux et maxillo-faciaux comme TECNOSS (Giaveno, Italie) qui propose plusieurs gammes de produits commerciaux dont Gen-Os OsteoBiol® produit à partir d'os porcine sous forme de granules, et ACE (Brockton, Etats-Unis) avec Block NuOss® sous forme de blocs avec 5% de collagène bovin. La mise sur le marché de tels substituts n'est possible qu'après vérification du respect de la norme ISO 10993 qui implique une absence de toxicité, de cytotoxicité, ainsi que l'absence de substances mutagènes ou encore de sensibilisant (ISO 10993 2018). Les applications visées pour le collagène de saumon dans ces travaux, à savoir, l'ingénierie tissulaire osseuse, vont demander encore beaucoup de travail de développement, cependant, le biomatériau peut également trouver des applications à plus courts termes en cosmétique notamment comme patch cutané ou masque pouvant

être combinés à divers composés actifs car les tests nécessaires et les régulations sont moins nombreux en cosmétique que dans le domaine médical (Sionkowska et al. 2020; Pistollato et al. 2021).

Les fractions enrichies en composés phénoliques bioactifs obtenues dans cette thèse ne sont pas complètement pures, cependant, elles l'ont été suffisamment pour permettre de déterminer la classe à laquelle les phlorotannins appartiennent (fuhalols, phloréthols et fucophlorethols). Il reste à déterminer la masse exacte de chaque composé, par spectrométrie de masse (analyses en cours d'acquisition) afin d'identifier la structure exacte des composés à l'origine des activités mesurées. Il pourra être intéressant d'utiliser une combinaison de molécules antibactériennes pouvant présenter différents mécanismes d'action afin de limiter l'apparition de résistances. Il sera tout de même nécessaire de caractériser exactement les molécules concernées pour espérer une utilisation en médecine et d'analyser les mécanismes d'actions. Pour cela, il faudrait réaliser des tests sur les facteurs de viabilité, de virulence et de colonisation bactérienne tels que la croissance, la mobilité, l'adhésion bactérienne, la formation de biofilm et le *quorum sensing* (QS) afin d'observer quel mécanisme est impacté par les composés phénoliques. En effet, les composés phénoliques ont déjà montré des activités antibactériennes par l'inhibition de la phosphorylation oxydative ou par leur capacité à se lier aux protéines membranaires bactériennes entraînant la lyse cellulaire (Shannon and Abu-Ghannam 2016). Ainsi, il serait plus intéressant de trouver des molécules impactant le QS ou la formation de biofilm, car si les molécules inhibent de façon non-toxique le développement des communautés microbiennes sans entraîner la mort cellulaire, la pression sélective sera plus faible et aura moins tendance à provoquer l'émergence de résistance (Bouyahya et al. 2017). Le QS est un système de communication intercellulaire qui permet la régulation de gènes en fonction de stimuli extérieurs tels que la sécrétion bactérienne d'auto-inducteurs selon la densité cellulaire de la population (Vasavi et al. 2013, 2016; Bouyahya et al. 2017; Sankar Ganesh and Ravishankar Rai 2018). Plusieurs activités bactériennes sont ainsi contrôlées par le QS comme la pathogénicité, la résistance aux antibiotiques et la formation du biofilm microbien. Les auto-inducteurs intraspécifiques les plus étudiés sont l'acyl homosérine lactone (AHL) pour les bactéries à Gram-négatif et la signalisation à base d'oligopeptides (AIP) chez les bactéries à Gram-positif (Bouyahya et al. 2017; Sankar Ganesh and Ravishankar Rai 2018). L'analyse des activités anti-QS et anti-biofilm des composés phénoliques pourra être réalisée par un test colorimétrique avec la bactérie *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. Cette bactérie à Gram-négatif synthétise un pigment, la violacéine, par l'action de cinq gènes dont l'expression dépend d'un complexe à base d'AHL. Ainsi, en mesurant l'inhibition de la violacéine, il est possible de déterminer l'inhibition de l'AHL et, par extension, celle du QS (Vasavi et al. 2016; Kothari et al. 2017). Il est également possible de mesurer l'inhibition de l'AHL par la quantification de l'expression de l'AHL synthase par PCR (Burt et al. 2014). Des extraits de *Centella asiatica* enrichis en flavonoïdes avaient

présenté une activité anti-QS sur *C. violaceum* CV026 (extrait éthanol 90%) et sur *C. violaceum* ATCC 12472 (fraction acétate d'éthyle) sans affecter la croissance, ainsi qu'une activité anti-biofilm sur *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) (fraction acétate d'éthyle) au même niveau que le kaempférol (Vasavi et al. 2016). Les composés phénoliques de ce travail de thèse ont présenté des activités antibactériennes majoritairement sur des bactéries à Gram-positif, ainsi, il serait intéressant d'analyser les activités anti-biofilm également sur des bactéries à Gram-positif telles que *Staphylococcus aureus* MA/FR/032/0074 via la méthode du violet de gentiane (ou cristal violet) (Burt et al. 2014; Santos et al. 2018). Une fois les molécules actives caractérisées, il faudra effectuer des tests de cytotoxicité. Ainsi, des tests sur des lignées cellulaires sont à envisager comme sur la lignée cellulaire chondrogénique de souris ATDC5 via le test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium). C'est une méthode de réduction basée sur la capacité des déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes à convertir le MTT en cristaux colorés de formazan (Gonçalves-Fernández et al. 2019).

La production de composés phénoliques par les végétaux marins dépend fortement des sites et des saisons de récolte, des différents stades de croissance et de la phénologie des organismes (Connan et al. 2004; Le Lann et al. 2016; Gager et al. 2020). Pour pallier ces fluctuations et avoir des apports constants en grande quantité, il faudrait pouvoir produire ces composés phénoliques par l'intermédiaire d'outils moléculaires et de l'ingénierie métabolique microbienne. Cependant, les caractérisations précises des composés d'intérêt, ainsi que leur voie de biosynthèse seront nécessaires pour les produire par l'intermédiaire de levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* ou de bactéries telles que *Escherichia coli* et dans une moindre mesure *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* ou différentes espèces de *Streptomyces*. En effet, en modifiant le génome de ces organismes, il est possible de les transformer en usine de production de différents composés. Ces microorganismes sont les plus utilisés pour la synthèse de molécules telles que des enzymes, des médicaments, des produits chimiques et des biocarburants car ce sont des ressources renouvelables avec une croissance rapide, de plus, leurs cultures et leurs physiologies sont maîtrisées. La connaissance de leur patrimoine génétique en association avec des outils génétiques permettent la production de diverses molécules (Du et al. 2011). Cette synthèse microbienne présente plusieurs avantages face à la synthèse chimique, elle est plus écologique, en évitant l'utilisation de métaux lourds, de solvants organiques, d'acides forts et de bases fortes, et peu de sous-produits sont formés par la spécificité enzymatique. Certains composés complexes présentent des voies de biosynthèses naturelles alors que les voies de synthèses chimiques seraient difficiles à mettre en place. Et enfin, le rendement et la productivité d'un composé ciblé par l'ingénierie métabolique sont meilleurs, tandis que la biosynthèse combinatoire permet de créer de nouveaux dérivés avec une possibilité d'utilisation à grande échelle (Du et al. 2011; Mao et al. 2017; Rainha et al. 2020; Sun et al. 2021). Il a notamment été montré que *S. cerevisiae* et *E. coli*

permettaient la synthèse d'alcaloïdes, de terpènes, de flavonoïdes ou de peptides non-ribosomiaux, y compris des molécules provenant du monde marin comme le squalène (un terpène originaire du requin, espèce menacée), l'astaxanthine (un caroténoïde originaire des déchets de crevettes) ou des omégas 3 (EPA : acide eicosapentaénoïque et DHA : acide docosahexaénoïque) (Du et al. 2011; Mao et al. 2017; Rainha et al. 2020). Les composés phénoliques produits par ces voies de synthèse sont généralement des composés de végétaux supérieurs tels que l'acide gallique, l'hydroxytyrosol, le pyrogallol ou encore des acides hydroxycinnamiques (acides coumarique et caféique) et des flavonoïdes (quercétine et kaempférol), par exemple (Rainha et al. 2020; Sun et al. 2021). De nos jours, les tests de biosynthèse métabolique ne sont pas utilisés pour produire des composés phénoliques de macroalgues probablement car leurs voies de biosynthèses restent encore méconnues. Cette limite technique sera peut-être surmontée dans le futur mais, actuellement, l'approvisionnement de composés phénoliques de macroalgues peut être fait par des méthodes biochimiques comme présentées dans cette thèse. Il est également envisageable de réaliser du forçage métabolique au sein des cultures de macroalgues afin d'augmenter la production des composés phénoliques qui est impactée par l'environnement selon l'intensité des stress (Connan et al. 2004; Le Lann et al. 2016; Gager et al. 2020; Lalegerie et al. 2020). Les composés obtenus, une fois purifiés et caractérisés pourront servir pour l'industrie cosmétique en tant que conservateurs naturels à condition qu'ils respectent la norme NF EN ISO 11930 sur la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique. Pour une utilisation dans le domaine médical, cela prendra beaucoup de temps, les résultats de cette étude sont les prémices de futures applications possibles (ISO 11930 2019). En effet, les composés devront être testés pour évaluer les propriétés d'ADME-Tox (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicité) afin d'analyser leur comportement, ainsi que leur devenir au sein de l'organisme pour les envisager en tant qu'agents antibactériens au stade préclinique (Li 2001; Tetko et al. 2006; Tokali et al. 2022). Ces paramètres avaient été pris en compte dans le projet BlueHuman mais le partenaire en charge n'a pas pu assurer les tests.

## 6. CONCLUSION GENERALE

L'ensemble de mes travaux a permis de faire progresser la réflexion et les connaissances scientifiques sur les points suivants :

- Le collagène de saumon obtenu à partir de biomasse sous-exploitée présente un fort potentiel en tant que biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire osseuse.
- La réticulation enzymatique par MTG permet d'améliorer les propriétés du biomatériau de collagène de saumon. Cette réticulation est une alternative viable à la réticulation chimique par GTA sans les risques de cytotoxicité. De plus, le collagène de saumon réticulé par voie enzymatique présente des propriétés mécaniques améliorées qui permettent d'envisager son utilisation en remplacement du collagène de porc pour l'ingénierie tissulaire.

Ainsi, les coproduits de saumon qui font actuellement l'objet d'une valorisation dite « de masse » pour produire de la farine animale pourraient être orientés vers des voies de valorisation à plus haute valeur ajoutée, dans les secteurs de la cosmétique à court terme, ou de la médecine à plus long terme. Ces nouvelles voies de valorisation nécessitent de réorganiser et d'améliorer la méthode de collecte des peaux de saumon, afin d'en assurer la qualité par un tri rigoureux, de limiter les risques de contaminations bactériennes, et de garantir la traçabilité et le respect de la chaîne du froid.

- Nous avons par ailleurs démontré que les végétaux marins *Beta maritima*, *Bifurcaria bifurcata* et *Plantago lanceolata* possèdent des composés phénoliques (furalols, phloréthols et fucophlorethols pour *B. bifurcata*, verbascoside pour *P. lanceolata*) présentant des activités ostéogéniques et antibactériennes qui seraient susceptibles d'intéresser le domaine de l'ingénierie tissulaire, en complément des hydrogels à base de collagène de saumon réticulé par la MTG.
- Nous avons développé un nouveau procédé de purification/concentration de ces composés phénoliques bioactifs qui s'appuie sur l'utilisation de la résine Diaion HP-20 avec comme solvant l'éthanol et qui est éco-respectueux de l'environnement.

Ces travaux de thèse pourraient être le point de départ de futures études dédiées à la fonctionnalisation, par des composés phénoliques d'origine marine, de matrices à base de collagène de saumon réticulé par voie enzymatique pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse.







---

# REFERENCES

---

## - A -

- Abdala-Díaz RT, Cabello-Pasini A, Pérez-Rodríguez E, et al (2006) Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Mar Biol* 148:459–465. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0102-6>
- Abou Neel EA, Bozec L, Knowles JC, et al (2013) Collagen - Emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv Drug Deliv Rev* 65:429–456. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.010>
- Abraham LC, Zuena E, Perez-Ramirez B, Kaplan DL (2008) Guide to collagen characterization for biomaterial studies. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 87:264–285. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31078>
- Abu Khalaf R, Alhusban AA, Al-Shalabi E, et al (2019) Isolation and structure elucidation of bioactive polyphenols, 1st edn. Elsevier Inc.
- Acevedo CA, Díaz-Calderón P, López D, Enrione J (2015) Assessment of gelatin-chitosan interactions in films by a chemometrics approach. *CYTA - J Food* 13:227–234. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.944570>
- Acevedo CA, Sánchez E, Orellana N, et al (2019) Re-epithelialization appraisal of skin wound in a porcine model using a salmon-gelatin based biomaterial as wound dressing. *Pharmaceutics* 11:196. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050196>
- Achet D, He XW (1995) Determination of the renaturation level in gelatin films. *Polymer (Guildf)* 36:787–791. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(95\)93109-Y](https://doi.org/10.1016/0032-3861(95)93109-Y)
- Adamiak K, Sionkowska A (2020) Current methods of collagen cross-linking: Review. *Int J Biol Macromol* 161:550–560. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.075>
- Agregán R, Munekata P, Franco D, et al (2018) Antioxidant potential of extracts obtained from macro- (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*) and micro-Algae (*Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*) assisted by ultrasound. *Medicines* 5:33. <https://doi.org/10.3390/medicines5020033>
- Agregán R, Munekata PES, Franco D, et al (2017) Phenolic compounds from three brown seaweed species using LC-DAD–ESI-MS/MS. *Food Res Int* 99:979–985. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.043>
- Ahmad M, Benjakul S, Nalinanon S (2010) Compositional and physicochemical characteristics of acid solubilized collagen extracted from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Hydrocoll* 24:588–594. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.03.001>
- Ahmad T, Ismail A, Ahmad SA, et al (2017) Recent advances on the role of process variables affecting gelatin yield and characteristics with special reference to enzymatic extraction: A review. *Food Hydrocoll* 63:85–96. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.007>
- Al Anouti F, Taha Z, Shamim S, et al (2019) An insight into the paradigms of osteoporosis: From genetics to biomechanics. *Bone Reports* 11:100216. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2019.100216>
- Al Khawli F, Pateiro M, Domínguez R, et al (2019) Innovative green technologies of intensification for valorization of seafood and their by-products. *Mar Drugs* 17:689. <https://doi.org/10.3390/md17120689>
- Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI (2021) Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci* 4:200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Albrektsson T, Johansson C (2001) Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10:S96–

- S101. <https://doi.org/10.1007/s005860100282>
- Alemu F, Andualem B (2014) Antimicrobial potentials of different solvent extracts of *Justicia landonoides* and *Plantago lanceolata* against standard and drug resistant human bacterial pathogens. *Int J Microbiol Res* 5:6–18. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2014.5.1.81234>
- Ali A, Wei S, Liu Z, et al (2021) Non-thermal processing technologies for the recovery of bioactive compounds from marine by-products. *Lwt* 147:111549. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111549>
- Alipieva K, Korkina L, Orhan IE, Georgiev MI (2014) Verbascoside - A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnol Adv* 32:1065–1076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.001>
- Alves AL, Marques ALP, Martins E, et al (2017) Cosmetic potential of marine fish skin collagen. *Cosmetics* 4:39. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4040039>
- Alves C, Pinteus S, Simões T, et al (2016) *Bifurcaria bifurcata*: a key macro-alga as a source of bioactive compounds and functional ingredients. *Int J Food Sci Technol* 51:1638–1646. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13135>
- Alves Macedo J, Durães Sette L, Harumi Sato H (2010) A comparative biochemical characterization of microbial transglutaminases: Commercial vs. a newly isolated enzyme from *Streptomyces sp.* *Food Bioprocess Technol* 3:308–314. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0209-8>
- Amador-Castro F, García-Cayuela T, Alper HS, et al (2021) Valorization of pelagic *Sargassum* biomass into sustainable applications: Current trends and challenges. *J Environ Manage* 283:112013. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112013>
- Aminina NM, Karaulova EP, Vishnevskaya TI, et al (2020) Characteristics of polyphenolic content in brown algae of the Pacific coast of Russia. *Molecules* 25:1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules25173909>
- Anastas P, Eghbali N (2010) Green chemistry: principles and practice. *Chem Soc Rev* 39:301–312. <https://doi.org/10.1039/b918763b>
- Annamalai RT, Hong X, Schott NG, et al (2019) Injectable osteogenic microtissues containing mesenchymal stromal cells conformally fill and repair critical-size defects. *Biomaterials* 208:32–44. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.04.001>
- Ar Gall E, Lechat F, Hupel M, et al (2015) Extraction and purification of phlorotannins from brown algae. *Nat Prod From Mar Algae Methods Protoc Methods Mol Biol* 1308:131–143. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2684-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2684-8_7)
- Arnesen JA, Gildberg A (2007) Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresour Technol* 98:53–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.021>
- Aubin JE (2001) Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2:81–94
- Audibert L, Fauchon M, Blanc N, et al (2010) Phenolic compounds in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: Distribution and radical-scavenging activities. *Phytochem Anal* 21:399–405. <https://doi.org/10.1002/pca.1210>
- Awan M, Buriak I, Fleck R, et al (2020) Dimethyl sulfoxide: A central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regen Med* 15:1463–1491. <https://doi.org/10.2217/rme-2019-0145>

## - B -

- Bae I, Osatomi K, Yoshida A, et al (2008) Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. *Food Chem* 108:49–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.039>
- Banfi G, Iorio EL, Corsi MM (2008) Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. *Clin Chem Lab Med* 46:1550–1555. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.302>
- Barnes CP, Pemble IV CW, Brand DD, et al (2007) Cross-linking electrospun type II collagen tissue engineering scaffolds with carbodiimide in ethanol. *Tissue Eng* 13:1593–1605. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0292>
- Barrère F, Mahmood TA, de Groot K, van Blitterswijk CA (2008) Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *Mater Sci Eng R Reports* 59:38–71. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.12.001>
- Bateman JF, Boot-Handford RP, Lamandé SR (2009) Genetic diseases of connective tissues: Cellular and extracellular effects of ECM mutations. *Nat Rev Genet* 10:173–183. <https://doi.org/10.1038/nrg2520>
- Battisti R, Fronza N, Vargas Júnior Á, et al (2017) Gelatin-coated paper with antimicrobial and antioxidant effect for beef packaging. *Food Packag Shelf Life* 11:115–124. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.01.009>
- Bazargani MM, Rohloff J (2016) Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control* 61:156–164. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.036>
- Beara IN, Lesjak MM, Jovin ED, et al (2009) Plantain (*Plantago* L.) species as novel sources of flavonoid antioxidants. *J Agric Food Chem* 57:9268–9273. <https://doi.org/10.1021/jf902205m>
- Bello AB, Kim D, Kim D, et al (2020) Engineering and functionalization of gelatin biomaterials: From cell culture to medical applications. *Tissue Eng - Part B Rev* 26:164–180. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0256>
- Berendt AR, Peters EJG, Bakker K, et al (2008) Diabetic foot osteomyelitis: a progress report on diagnosis and a systematic review of treatment. *Diabetes Metab Res Rev* 24:S145–S161. <https://doi.org/10.1002/dmrr.836>
- Bergen DJM, Kague E, Hammond CL (2019) Zebrafish as an emerging model for osteoporosis: A primary testing platform for screening new osteo-active compounds. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10:1–20. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00006>
- Bermueller C, Schwarz S, Elsaesser AF, et al (2013) Marine collagen scaffolds for nasal cartilage repair: Prevention of nasal septal perforations in a new orthotopic rat model using tissue engineering techniques. *Tissue Eng - Part A* 19:2201–2214. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0650>
- Bhagwat PK, Dandge PB (2018) Collagen and collagenolytic proteases: A review. *Biocatal Agric Biotechnol* 15:43–55. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.005>
- Bhat R, Karim AA (2009) Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocoll* 23:563–576. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002>
- Biancardi E, Panella LW, Lewellen RT (2012) *Beta maritima*. Springer New York, New York, NY
- Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, et al (2001) Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials* 22:763–768. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00236-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00236-2)

- Bikels-Goshen T, Landau E, Saguy S, Shapira R (2010) Staphylococcal strains adapted to epigallocatechin gallate (EGCG) show reduced susceptibility to vancomycin, oxacillin and ampicillin, increased heat tolerance, and altered cell morphology. *Int J Food Microbiol* 138:26–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.011>
- Birt MC, Anderson DW, Bruce Toby E, Wang J (2017) Osteomyelitis: Recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies. *J Orthop* 14:45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jor.2016.10.004>
- Biswal T (2021) Biopolymers for tissue engineering applications : A review. *Mater Today Proc* 41:397–402. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.09.628>
- Bode F, Da Silva MA, Drake AF, et al (2011) Enzymatically cross-linked tilapia gelatin hydrogels: Physical, chemical, and hybrid networks. *Biomacromolecules* 12:3741–3752. <https://doi.org/10.1021/bm2009894>
- Bonnet R, BRU J-P, CARON F, et al (2017) EUCAST Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Société Française Microbiol* 1:125
- Bouyahya A, Dakka N, Et-Touys A, et al (2017) Medicinal plant products targeting *quorum sensing* for combating bacterial infections. *Asian Pac J Trop Med* 10:729–743. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.021>
- Breton F, Cérantola S, Ar Gall E (2011) Distribution and radical scavenging activity of phenols in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *J Exp Mar Bio Ecol* 399:167–172. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.01.002>
- Broderick EP, O'Halloran DM, Rochev YA, et al (2005) Enzymatic stabilization of gelatin-based scaffolds. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 72:37–42. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30119>
- Burt SA, Ojo-Fakunle VTA, Woertman J, Veldhuizen EJA (2014) The natural antimicrobial carvacrol inhibits *quorum sensing* in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS One* 9:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093414>
- Buttafoco L, Engbers-Buijtenhuijs P, Root AA, et al (2006) First steps towards tissue engineering of small-diameter blood vessels: preparation of flat scaffolds of collagen and elastin by means of freeze drying. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 77:357–368. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30444>

## - C -

- Carson MA, Clarke SA (2018) Bioactive compounds from marine organisms: Potential for bone growth and healing. *Mar Drugs* 16:340. <https://doi.org/10.3390/md16090340>
- Carson MA, Nelson J, Cancela ML, et al (2018) Screening for osteogenic activity in extracts from Irish marine organisms: The potential of *Ceramium pallidum*. *PLoS One* 13:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207303>
- Caruso G, Floris R, Serangeli C, Di Paola L (2020) Fishery wastes as a yet undiscovered treasure from the sea: Biomolecules sources, extraction methods and valorization. *Mar Drugs* 18:622. <https://doi.org/10.3390/md18120622>
- Centella MH, Arévalo-Gallegos A, Parra-Saldivar R, Iqbal HMN (2017) Marine-derived bioactive compounds for value-added applications in bio- and non-bio sectors. *J Clean Prod* 168:1559–1565. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.05.086>
- Cérantola S, Breton F, Gall EA, Deslandes E (2006) Co-occurrence and antioxidant activities of fucol and

- fucophloretol classes of polymeric phenols in *Fucus spiralis*. Bot Mar 49:347–351. <https://doi.org/10.1515/BOT.2006.042>
- Chambi H, Grosso C (2006) Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. Food Res Int 39:458–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.09.009>
- Chandika P, Ko SC, Oh GW, et al (2015) Fish collagen/alginate/chitooligosaccharides integrated scaffold for skin tissue regeneration application. Int J Biol Macromol 81:504–513. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.038>
- Charpentier G, Hemon M, Guerard F, et al (2016) Collagen extracted from fish skins
- Charulatha V, Rajaram A (2003) Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. Biomaterials 24:759–767. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00412-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00412-X)
- Chatterji PR (1989) Gelatin with hydrophilic/hydrophobic grafts and glutaraldehyde crosslinks. J Appl Polym Sci 37:2203–2212. <https://doi.org/10.1002/app.1989.070370812>
- Chau DYS, Collighan RJ, Verderio EAM, et al (2005) The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen. Biomaterials 26:6518–6529. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.017>
- Chaugule SR, Indap MM, Chiplunkar S V. (2017) Marine natural products: New avenue in treatment of osteoporosis. Front Mar Sci 4:384. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00384>
- Chen MM, Huang YQ, Guo H, et al (2014) Preparation, characterization, and potential biomedical application of composite sponges based on collagen from silver carp skin. J Appl Polym Sci 131:1–8. <https://doi.org/10.1002/app.40998>
- Chen RN, Ho HO, Sheu MT (2005) Characterization of collagen matrices crosslinked using microbial transglutaminase. Biomaterials 26:4229–4235. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.11.012>
- Chen T, Embree HD, Brown EM, et al (2003) Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: Potential for in situ applications. Biomaterials 24:2831–2841. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00096-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00096-6)
- Chen X, Shi Q (2013) Research on sol-gel transition process of gelatin. Adv Mater Res 683:474–478. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.683.474>
- Cheng S, Wang W, Li Y, et al (2019) Cross-linking and film-forming properties of transglutaminase-modified collagen fibers tailored by denaturation temperature. Food Chem 271:527–535. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.223>
- Chihara S, Segreti J (2010) Osteomyelitis. Disease-a-Month 56:6–31. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2009.07.001>
- Chiou B Sen, Avena-Bustillos RJ, Shey J, et al (2006) Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins. Polymer (Guildf) 47:6379–6386. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.07.004>
- Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, Catignani GL (1983) Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. J Dairy Sci 66:1219–1227. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81926-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2)
- Clark JH (1999) Green chemistry challenges and opportunities. Green Chem 1:1–8
- Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, et al (2007) Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. BMC Microbiol 7:1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-101>

- Coelho RCG, Marques ALP, Oliveira SM, et al (2017) Extraction and characterization of collagen from Antarctic and Sub-Antarctic squid and its potential application in hybrid scaffolds for tissue engineering. *Mater Sci Eng C* 78:787–795. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.122>
- Commission E (2009) Commission regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Off J Eur Union* 1–130
- Connan S, Delisle F, Deslandes E, Ar Gall E (2006) Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Bot Mar* 49:39–46. <https://doi.org/10.1515/BOT.2006.005>
- Connan S, Goulard F, Stiger V, et al (2004) Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Bot Mar* 47:410–416. <https://doi.org/10.1515/BOT.2004.057>
- Córdoba A, Satué M, Gómez-Florit M, et al (2015) Flavonoid-modified surfaces: Multifunctional bioactive biomaterials with osteopromotive, anti-inflammatory, and anti-fibrotic potential. *Adv Healthc Mater* 4:540–549. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400587>
- Correia C, Sousa RO, Vale AC, et al (2022) Adhesive and biodegradable membranes made of sustainable catechol-functionalized marine collagen and chitosan. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 213:. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112409>
- Cotas J, Leandro A, Monteiro P, et al (2020) Seaweed phenolics: from extraction to applications. *Mar Drugs* 18:384
- Creis E (2015) Etude de la voie de biosynthèse des phlorotannins chez les algues brunes, de la caractérisation biochimique d'enzymes recombinantes à l'étude des réponses écophysiological

## - D -

- Da Silva K, Kumar P, Van Vuuren SF, et al (2021) Three-dimensional printability of an ECM-based gelatin methacryloyl (GelMA) biomaterial for potential neuroregeneration. *ACS omega* 6:21368–21383. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01903>
- Da Silva MA, Bode F, Drake AF, et al (2014) Enzymatically cross-linked gelatin/chitosan hydrogels: Tuning gel properties and cellular response. *Macromol Biosci* 14:817–830. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300472>
- Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15:7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Davison IR, Pearson GA (1996) Stress tolerance in intertidal seaweeds. *J Phycol* 32:197–211
- De Carvalho RA, Grosso CRF (2004) Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocoll* 18:717–726. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.10.005>
- De Carvalho W, Djabourov M (1997) Physical gelation under shear for gelatin gels. *Rheol Acta* 36:591–609. <https://doi.org/10.1007/BF00367355>
- De Jesus Raposo MF, De Morais AMB, De Morais RMSC (2015) Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Mar Drugs* 13:2967–3028. <https://doi.org/10.3390/md13052967>
- Del Mondo A, Smerilli A, Ambrosino L, et al (2021) Insights into phenolic compounds from microalgae: structural variety and complex beneficial activities from health to nutraceuticals. *Crit Rev Biotechnol* 41:155–171. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1874284>



- Deribew F, Endale M, Melaku Y (2018) Antibacterial and antioxidant phenylpropanoid derivative from the leaves of *Plantago lanceolate*. *Nat Prod Chem Res* 6:2. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000315>
- Desbois AP, Smith VJ (2015) Disk diffusion assay to assess the antimicrobial activity of marine algal extracts. In: *Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols*. pp 403–410
- Díaz-Calderón P, Flores E, González-Muñoz A, et al (2017) Influence of extraction variables on the structure and physical properties of salmon gelatin. *Food Hydrocoll* 71:118–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.004>
- Díaz P, López D, Matiacevich S, et al (2011) State diagram of salmon (*Salmo salar*) gelatin films. *J Sci Food Agric* 91:2558–2565. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4451>
- Diogo GS, Carneiro F, Freitas-Ribeiro S, et al (2021) *Prionace glauca* skin collagen bioengineered constructs as a promising approach to trigger cartilage regeneration. *Mater Sci Eng C* 120:. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111587>
- Diogo GS, López-Senra E, Pirraco RP, et al (2018) Marine collagen/apatite composite scaffolds envisaging hard tissue applications. *Mar Drugs* 16:1–14. <https://doi.org/10.3390/md16080269>
- Djabourov M (1988) Architecture of gelatin gels. *Contemp Phys* 29:273–297. <https://doi.org/10.1080/00107518808224377>
- Djabourov M (1991) Gelation—A review. *Polym Int* 25:135–143. <https://doi.org/10.1002/pi.4990250302>
- Djabourov M, Leblond J, Papon P (1988a) Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. *J Phys* 49:319–332
- Djabourov M, Leblond J, Papon P (1988b) Gelation of aqueous gelatin solutions. II. Rheology of the sol-gel transition. *J Phys* 49:333–343
- Djabourov M, Lechaire J-P, Gaill F (1993) Structure and rheology of gelatin gels. *Biorheology* 30:191–205
- Drury JL, Mooney DJ (2003) Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24:4337–4351. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00340-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00340-5)
- Du J, Shao Z, Zhao H (2011) Engineering microbial factories for synthesis of value-added products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:873–890. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0970-3>

## - E -

- Echave MC, Hernández-Moya R, Iturriaga L, et al (2019) Recent advances in gelatin-based therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 19:773–779. <https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1610383>
- Efenberger-Szmechtyk M, Nowak A, Czyzowska A (2021) Plant extracts rich in polyphenols: antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 61:149–178. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1722060>
- Ehrlich H (2015) Marine Gelatins. In: *Biological Materials of Marine Origin*. pp 343–359
- El Moujahed S, Errachidi F, Abou Oualid H, et al (2022) Extraction of insoluble fibrous collagen for characterization and crosslinking with phenolic compounds from pomegranate byproducts for leather tanning applications. *RSC Adv* 12:4175–4186. <https://doi.org/10.1039/d1ra08059h>
- Elango J, Bu Y, Bin B, et al (2017) Effect of chemical and biological cross-linkers on mechanical and functional

properties of shark catfish skin collagen films. *Food Biosci* 17:42–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.12.002>

Elango J, Zhang J, Bao B, et al (2016) Rheological, biocompatibility and osteogenesis assessment of fish collagen scaffold for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 91:51–59.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.067>

Eltawila AM, Hassan MN, Safaan SM, et al (2021) Local treatment of experimental mandibular osteomyelitis with an injectable biomimetic gentamicin hydrogel using a new rabbit model. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 109:1677–1688. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34824>

Englert C, Blunk T, Müller R, et al (2007) Bonding of articular cartilage using a combination of biochemical degradation and surface cross-linking. *Arthritis Res & Therapy* 9:1–11. <https://doi.org/10.1186/ar2202>

Eom S, Kim Y, Kim S (2012) Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. *Food Chem Toxicol* 50:3251–3255. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.06.028>

Eysturskard J, Haug IJ, Elharfaoui N, et al (2009) Structural and mechanical properties of fish gelatin as a function of extraction conditions. *Food Hydrocoll* 23:1702–1711. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.008>

## - F -

FAO (2020) La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2020. La durabilité en action.

Fernando IPS, Lee WW, Ahn G (2021) Marine algal flavonoids and phlorotannins; an intriguing frontier of biofunctional secondary metabolites. *Crit Rev Biotechnol* 42:23–45.  
<https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1922351>

Ferraro V, Cruz IB, Jorge RF, et al (2010) Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. *Food Res Int* 43:2221–2233. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.034>

Ferrazzano GF, Cantile T, Roberto L, et al (2015) Determination of the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity on salivary streptococci and lactobacilli and chemical characterisation of the phenolic content of a *Plantago lanceolata* infusion. *Biomed Res Int* 2015:. <https://doi.org/10.1155/2015/286817>

Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G (2012) Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater* 8:3191–3200. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.014>

Flores-Molina MR, Thomas D, Lovazzano C, et al (2014) Desiccation stress in intertidal seaweeds: Effects on morphology, antioxidant responses and photosynthetic performance. *Aquat Bot* 113:90–99.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2013.11.004>

Folk JE (1970) Transglutaminase (Guinea Pig Liver). *Methods Enzymol* 17:889–894.  
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(71\)17302-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(71)17302-8)

## - G -

Gager L, Connan S, Molla M, et al (2020) Active phlorotannins from seven brown seaweeds commercially harvested in Brittany (France) detected by 1H NMR and *in vitro* assays: temporal variation and potential valorization in cosmetic applications. *J Appl Phycol* 32:2375–2386. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-02022-1>

- Gager L, Lalegerie F, Connan S, Stiger-Pouvreau V (2021) Marine algal derived for medicinal and cosmetic their biological activities phenolic compounds and applications. *Recent Adv Micro- Macroalgal Process Food Heal Perspect* 278–334. <https://doi.org/10.1002/9781119542650>
- Gasink LB, Fishman NO, Weiner MG, Nachamkin I (2006) Fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* : Assessment of risk factors and clinical impact. *Am J Med* 119:526. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2005.11.029>
- Gelse K, Pöschl E, Aigner T (2003) Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55:1531–1546. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>
- Gitelis S, Brebach GT (2002) The treatment of chronic osteomyelitis with a biodegradable antibiotic-impregnated implant. *J Orthop Surg* 10:53–60. <https://doi.org/10.1177/230949900201000110>
- Glowacki J, Mizuno S (2008) Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers* 89:338–344. <https://doi.org/10.1002/bip.20871>
- Gómez-Estaca J, Montero P, Fernández-Martín F, Gómez-Guillén MC (2009) Physico-chemical and film-forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: A comparative study. *J Food Eng* 90:480–486. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.022>
- Gómez-Guillén M., Turnay J, Fernández-Díaz M., et al (2002) Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocoll* 16:25–34. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00035-2)
- Gomez-Guillén MC, Sarabia AI, Solas MT, Montero P (2001) Effect of microbial transglutaminase on the functional properties of megrim (*Lepidorhombus boscii*) skin gelatin. *J Sci Food Agric* 81:665–673. <https://doi.org/10.1002/jsfa.865>
- Gonçalves-Fernández C, Sineiro J, Moreira R, Gualillo O (2019) Extraction and characterization of phlorotannin-enriched fractions from the Atlantic seaweed *Bifurcaria bifurcata* and evaluation of their cytotoxic activity in murine cell line. *J Appl Phycol* 31:2573–2583. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1729-2>
- Gonçalves S, Moreira E, Andrade PB, et al (2019) Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the total phenolic contents and antioxidant activity of wild Mediterranean edible plant extracts. *Eur Food Res Technol* 245:753–762. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3197-y>
- Gonçalves S, Romano A (2016) The medicinal potential of plants from the genus *Plantago* (Plantaginaceae). *Ind Crops Prod* 83:213–226. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.038>
- Gong W, Zhang N, Cheng G, et al (2019) *Rehmannia glutinosa* Libosch extracts prevent bone loss and architectural deterioration and enhance osteoblastic bone formation by regulating the IGF-1/PI3K/mTOR pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Mol Sci* 20:3964. <https://doi.org/10.3390/ijms20163964>
- Grassmann J, Hippeli S, Elstner EF (2002) Plant's defence and its benefits for animals and medicine: Role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiol Biochem* 40:471–478. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01395-5](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01395-5)
- Gu L, Shan T, Ma Y xuan, et al (2019) Novel biomedical applications of crosslinked collagen. *Trends Biotechnol* 37:464–491. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.007>

## - H -

- Habauzit V, Horcajada MN (2008) Phenolic phytochemicals and bone. *Phytochem Rev* 7:313–344. <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9078-9>
- Hanh TTH, Cham PT, Do HA, et al (2020) Iridoid glucosides and phenylethanoid glycosides from *Plantago major*. *Phytochem Lett* 39:111–115. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.07.010>
- Haq F, Ahmed N, Qasim M (2019) Comparative genomic analysis of collagen gene diversity. *3 Biotech* 9:1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1616-9>
- Harput US, Genc Y, Saracoglu I (2012) Cytotoxic and antioxidative activities of *Plantago lagopus* L. and characterization of its bioactive compounds. *Food Chem Toxicol* 50:1554–1559. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.01.019>
- Harrington WF, Rao NV (1970) Collagen structure in solution. I. Kinetics of helix regeneration in single-chain gelatins. *Biochemistry* 9:3714–3724. <https://doi.org/10.1021/bi00821a010>
- Hartemann-Heurtier A, Senneville E (2008) Diabetic foot osteomyelitis. *Diabetes Metab* 34:87–95. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2007.09.005>
- Haug JJ, Draget KI (2011) Gelatin. In: *Handbook of Food Proteins*. pp 92–115
- Heffernan N, Smyth TJ, Soler-Villa A, et al (2015) Phenolic content and antioxidant activity of fractions obtained from selected Irish macroalgae species (*Laminaria digitata*, *Fucus serratus*, *Gracilaria gracilis* and *Codium fragile*). *J Appl Phycol* 27:519–530. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0291-9>
- Hellio C, De La Broise D, Dufosse L, et al (2001a) Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Mar Environ Res* 52:231–247
- Hellio C, Thomas-Guyon H, Culioli G, et al (2001b) Marine antifoulants from *Bifurcaria bifurcata* (Phaeophyceae, Cystoseiraceae) and other brown macroalgae. *Biofouling* 17:189–201. <https://doi.org/10.1080/08927010109378478>
- Hemon M, Gu erard F, Fagon R, et al (2016) *Wo* 2016/142633
- Henn JG, Steffens L, de Moura Sperotto ND, et al (2019) Toxicological evaluation of a standardized hydroethanolic extract from leaves of *Plantago australis* and its major compound, verbascoside. *J Ethnopharmacol* 229:145–156. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.003>
- Hollinger JO, Einhorn TA, Doll B, Sfeir C (2004) *Bone Tissue Engineering*, 1st Editio. CRC Press, New York, NY
- Horta A, Pinteus S, Alves C, et al (2014) Antioxidant and antimicrobial potential of the *Bifurcaria bifurcata* epiphytic bacteria. *Mar Drugs* 12:1676–1689. <https://doi.org/10.3390/md12031676>
- Hoyer B, Bernhardt A, Heinemann S, et al (2012) Biomimetically mineralized salmon collagen scaffolds for application in bone tissue engineering. *Biomacromolecules* 13:1059–1066. <https://doi.org/10.1021/bm201776r>
- Hoyer B, Bernhardt A, Lode A, et al (2014) Jellyfish collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* 10:883–892. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.022>
- Huang T, Tu Z cai, Shangguan X, et al (2019) Fish gelatin modifications: A comprehensive review. *Trends Food Sci Technol* 86:260–269. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.048>

## - I -

- Im J, Choi H, Mun F, et al (2017) A polycaprolactone/fish collagen/alginate biocomposite supplemented with phlorotannin for hard tissue regeneration. *RSC Adv* 7:2009–2018. <https://doi.org/10.1039/C6RA25182J>
- Imbs TI, Zvyagintseva TN (2018) Phlorotannins are polyphenolic metabolites of brown algae. *Russ J Mar Biol* 44:263–273. <https://doi.org/10.1134/S106307401804003X>
- Isaza Martínez JH, Torres Castañeda HG (2013) Preparation and chromatographic analysis of phlorotannins. *J Chromatogr Sci* 51:825–838. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt045>
- ISO 10993 (2018) Évaluation biologique des dispositifs médicaux — Partie 1: Évaluation et essais au sein d'un processus de gestion du risque. Norme Int ISO 10993-1:2018
- ISO 11930 (2019) Cosmétiques - Microbiologie - Évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique. Norme NF EN ISO 11930

## - J -

- Jégou C, Connan S, Bihannic I, et al (2021) Phlorotannin and pigment content of native canopy-forming Sargassaceae species living in intertidal rockpools in Brittany (France): Any relationship with their vertical distribution and phenology? *Mar Drugs* 19:504. <https://doi.org/10.3390/md19090504>
- Jeong B, Kim SW, Bae YH (2012) Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev* 64:154–162. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.012>
- Jiang Y, Fang Z, Leonard W, Zhang P (2021) Phenolic compounds in Lycium berry: Composition, health benefits and industrial applications. *J Funct Foods* 77:104340. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104340>
- Jimenez-Lopez C, Pereira AG, Lourenço-Lopes C, et al (2021) Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits. *Food Chem* 341:128262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128262>
- Johnell O, Kanis JA (2006) An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 17:1726–1733. <https://doi.org/10.1007/s00198-006-0172-4>
- Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, Tanaka M (2006) Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: Chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocoll* 20:1216–1222. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.01.006>
- Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, Tanaka M (2005) Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin. *J Sci Food Agric* 85:1203–1210. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2072>
- Jordana F, Le Visage C, Weiss P (2017) Substituts osseux. *Medecine/Sciences* 33:60–65. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173301010>
- Jurisc Grubescic R, Srečnik G, Kremer D, et al (2013) Simultaneous RP-HPLC-DAD separation, and determination of flavonoids and phenolic acids in *Plantago* L. species. *Chem Biodivers* 10:1305–1316. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200210>
- Jus S, Stachel I, Schloegl W, et al (2011) Cross-linking of collagen with laccases and tyrosinases. *Mater Sci Eng C*

## - K -

- Kaczmarek B, Mazur O (2020) Collagen-based materials modified by phenolic acids-A review. *Materials (Basel)* 13:3641. <https://doi.org/10.3390/MA13163641>
- Karadeniz F, Ahn BN, Kim JA, et al (2015) Phlorotannins suppress adipogenesis in pre-adipocytes while enhancing osteoblastogenesis in pre-osteoblasts. *Arch Pharm Res* 38:2172–2182. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0637-0>
- Khurana JS, McCarthy EF, Zhang PJ (2010) *Essentials in bone and soft-tissue pathology*
- Kim J, Yoon M, Yang H, et al (2014) Enrichment and purification of marine polyphenol phlorotannins using macroporous adsorption resins. *Food Chem* 162:135–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.035>
- Kim JH, Kim M, Jung HS, Sohn Y (2019) *Leonurus sibiricus* L. ethanol extract promotes osteoblast differentiation and inhibits osteoclast formation. *Int J Mol Med* 44:913–926. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4269>
- Knaepler H (2012) Local application of gentamicin-containing collagen implant in the prophylaxis and treatment of surgical site infection in orthopaedic surgery. *Int J Surg* 10:S15–S20. <https://doi.org/10.1016/j.ijso.2012.05.020>
- Koivikko R, Loponen J, Pihlaja K, Jormalainen V (2007) High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Phytochem Anal An Int J Plant Chem Biochem Tech* 18:326–332. <https://doi.org/10.1002/pca.986>
- Kołodziejaska B, Kafak A, Kolmas J (2020) Biologically inspired collagen/apatite composite biomaterials for potential use in bone tissue regeneration—A review. *Materials (Basel)* 13:1748. <https://doi.org/10.3390/ma13071748>
- Koshi R, Nakai K, Tanaka H, et al (2019) An extract of *Eisenia bicyclis* stimulates mineralized nodule formation by osteoblasts. *J Hard Tissue Biol* 28:359–364. <https://doi.org/10.2485/jhtb.28.359>
- Kothari V, Sharma S, Padia D (2017) Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*. *Asian Pac J Trop Med* 10:744–752. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.022>
- Krieghoff J, Picke AK, Salbach-Hirsch J, et al (2019) Increased pore size of scaffolds improves coating efficiency with sulfated hyaluronan and mineralization capacity of osteoblasts. *Biomater Res* 23:1–13. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0172-z>
- Kulshreshtha G, Burlot AS, Marty C, et al (2015) Enzyme-assisted extraction of bioactive material from *Chondrus crispus* and *Codium fragile* and its effect on *Herpes simplex virus* (HSV-1). *Mar Drugs* 13:558–580. <https://doi.org/10.3390/md13010558>

## - L -

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Laizé V, Gavaia PJ, Cancela ML (2014) Fish: a suitable system to model human bone disorders and discover drugs

- with osteogenic or osteotoxic activities. *Drug Discov Today Dis Model* 13:29–37. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2014.08.001>
- Lalegerie F, Gager L, Stiger-Pouvreau V, Connan S (2020) The stressful life of red and brown seaweeds on the temperate intertidal zone: effect of abiotic and biotic parameters on the physiology of macroalgae and content variability of particular metabolites. *Adv Bot Res* 95:247–287. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.11.007>
- Le Lann K, Connan S, Stiger-Pouvreau V (2012a) Phenology, TPC and size-fractioning phenolics variability in temperate *Sargassaceae* (Phaeophyceae, Fucales) from Western Brittany: Native versus introduced species. *Mar Environ Res* 80:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.05.011>
- Le Lann K, Ferret C, Vanmee E, et al (2012b) Total phenolic, size-fractionated phenolics and fucoxanthin content of tropical *Sargassaceae* (Fucales, Phaeophyceae) from the South Pacific Ocean: Spatial and specific variability. *Phycol Res* 60:37–50. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2011.00634.x>
- Le Lann K, Jégou C, Stiger-Pouvreau V (2008) Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: Comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R. Ross. *Phycol Res* 56:238–245. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2008.00505.x>
- Le Lann K, Surget G, Couteau C, et al (2016) Sunscreen, antioxidant, and bactericide capacities of phlorotannins from the brown macroalga *Halidrys siliquosa*. *J Appl Phycol* 28:3547–3559. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0853-0>
- Lee KY, Mooney DJ (2001) Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 101:1869–1880. <https://doi.org/10.1021/cr000108x>
- Lepetos P, Papavassiliou AG (2016) ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1862:576–591. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.01.003>
- Lew DP, Waldvogel FA (2004) Osteomyelitis. *Lancet* 364:369–79. <https://doi.org/10.1002/9781119421344.ch5>
- Leyton A, Vergara-Salinas JR, Pérez-Correa JR, Lienqueo ME (2017) Purification of phlorotannins from *Macrocystis pyrifera* using macroporous resins. *Food Chem* 237:312–319. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.114>
- Li AP (2001) Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug Discov Today* 6:357–366. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(01\)01712-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(01)01712-3)
- Li L, Tsao R, Liu Z, et al (2005) Isolation and purification of acteoside and isoacteoside from *Plantago psyllium* L. by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 1063:161–169. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.024>
- Li Y-X, Wijesekara I, Li Y, Kim S-K (2011) Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochem* 46:2219–2224. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.015>
- Lim YS, Ok YJ, Hwang SY, et al (2019) Marine collagen as a promising biomaterial for biomedical applications. *Mar Drugs* 17:. <https://doi.org/10.3390/md17080467>
- Lin K, Zhang D, Macedo MH, et al (2019) Advanced collagen-based biomaterials for regenerative biomedicine. *Adv Funct Mater* 29:. <https://doi.org/10.1002/adfm.201804943>

- Liu C, Han Z, Czernuszka JT (2009) Gradient collagen/nanohydroxyapatite composite scaffold: Development and characterization. *Acta Biomater* 5:661–669. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.022>
- Liu S, Lau CS, Liang K, et al (2022) Marine collagen scaffolds in tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol* 74:92–103. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.10.011>
- Liu Y, Weng R, Wang W, et al (2020) Tunable physical and mechanical properties of gelatin hydrogel after transglutaminase crosslinking on two gelatin types. *Int J Biol Macromol* 162:405–413. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.185>
- Lone R, Shuab R, Kamili AN (2020) Phenolics in sustainable agriculture
- Lv LC, Huang QY, Ding W, et al (2019) Fish gelatin: The novel potential applications. *J Funct Foods* 63:. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103581>

## - M -

- Maffulli N, Papalia R, Zampogna B, et al (2016) The management of osteomyelitis in the adult. *Surg* 14:345–360. <https://doi.org/10.1016/j.surge.2015.12.005>
- Mallick N, Mohn FH (2000) Reactive oxygen species : response of algal cells. *J Plant Physiol* 157:183–193. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80189-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80189-3)
- Malyarenko OS, Imbs TI, Ermakova SP (2020) *In vitro* anticancer and radiosensitizing activities of phlorethols from the brown alga *Costaria costata*. *Molecules* 25:3208. <https://doi.org/10.3390/molecules25143208>
- Mao X, Liu Z, Sun J, Lee SY (2017) Metabolic engineering for the microbial production of marine bioactive compounds. *Biotechnol Adv* 35:1004–1021. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.001>
- Marco C, Rosell CM (2008) Effect of different protein isolates and transglutaminase on rice flour properties. *J Food Eng* 84:132–139. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.05.003>
- Maréchal JP, Culioli G, Hellio C, et al (2004) Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *J Exp Mar Bio Ecol* 313:47–62. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.07.016>
- Marieb E, Hoehn K (2019) Anatomie et physiologie humaines
- Markel MD (2019) Bone structure and the response of bone to stress. In: *Equine Fracture Repair*, 2nd editio. pp 1–11
- Martiniakova M, Babikova M, Omelka R (2020) Pharmacological agents and natural compounds: Available treatments for osteoporosis. *J Physiol Pharmacol* 71:1–14. <https://doi.org/10.26402/jpp.2020.3.01>
- Mazzutti S, Riehl CAS, Ibañez E, Ferreira SRS (2017) Green-based methods to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*. *J Supercrit Fluids* 119:211–220. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.09.018>
- McDonald JI, Huisman JM, Hart FN, et al (2015) The first detection of the invasive macroalga *Codium fragile* subsp. *fragile* (Suringar) Hariot in Western Australia. *BiolInvasions Rec* 4:75–80. <https://doi.org/10.3391/bir.2015.4.2.01>
- Meot-Duros L, Le Floch G, Magné C (2008) Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of



- halophytic species. *J Ethnopharmacol* 116:258–262. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.024>
- Meot-Duros L, Magné C (2009) Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. *Plant Physiol Biochem* 47:37–41. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.09.006>
- Meslet-Cladière L, Delage L, Leroux CJ-J, et al (2013) Structure/function analysis of a type III polyketide synthase in the brown alga *Ectocarpus siliculosus* reveals a biochemical pathway in phlorotannin monomer biosynthesis. *Plant Cell* 25:3089–3103. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111336>
- Mieszowska A, Beaumont H, Martocq L, et al (2020) Phenolic-enriched collagen fibrillar coatings on titanium alloy to promote osteogenic differentiation and reduce inflammation. *Int J Mol Sci* 21:1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21176406>
- Mirahmadi F, Koolstra JH, Fazaeli S, et al (2019) Diffusion of charged and uncharged contrast agents in equine mandibular condylar cartilage is not affected by an increased level of sugar-induced collagen crosslinking. *J Mech Behav Biomed Mater* 90:133–139. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.10.022>
- Mitani T, Ota K, Inaba N, et al (2018) Antimicrobial activity of the phenolic compounds of prunus mume against enterobacteria. *Biol Pharm Bull* 41:208–212. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00711>
- Mohtar NF, Perera CO, Quek SY (2011) Utilisation of gelatine from NZ hoki (*Macruronus novaezelandiae*) fish skins. *Int Food Res J* 18:1111–1115
- Mohtar NF, Perera CO, Quek SY, Hemar Y (2013) Optimization of gelatine gel preparation from New Zealand hoki (*Macruronus novaezelandiae*) skins and the effect of transglutaminase enzyme on the gel properties. *Food Hydrocoll* 31:204–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.011>
- Morales P, Ferreira ICFR, Carvalho AM, et al (2014) Mediterranean non-cultivated vegetables as dietary sources of compounds with antioxidant and biological activity. *LWT - Food Sci Technol* 55:389–396. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.08.017>
- Moreira R, Sineiro J, Chenlo F, et al (2017) Aqueous extracts of *Ascophyllum nodosum* obtained by ultrasound-assisted extraction : effects of drying temperature of seaweed on the properties of extracts. *J Appl Phycol* 29:3191–3200. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1159-6>
- Moreno HM, Montero MP, Gómez-Guillén MC, et al (2012) Collagen characteristics of farmed Atlantic salmon with firm and soft fillet texture. *Food Chem* 134:678–685. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.160>
- Morimura S, Nagata H, Uemura Y, et al (2002) Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. *Prog Biochem* 37:1403–1412
- Munir M, Qureshi R, Bibi M, Khan AM (2019) Pharmaceutical aptitude of *Cladophora*: A comprehensive review. *Algal Res* 39:101476. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101476>
- Murphy CM, Duffy GP, Schindeler A, O'Brien FJ (2016) Effect of collagen-glycosaminoglycan scaffold pore size on matrix mineralization and cellular behavior in different cell types. *J Biomed Mater Res - Part A* 104:291–304. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35567>
- Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ (2010) The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 31:461–466. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.063>

## - N -

- Naffa R, Maidment C, Ahn M, et al (2019) Molecular and structural insights into skin collagen reveals several factors that influence its architecture. *Int J Biol Macromol* 128:509–520. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.151>
- Nagai N, Nakayama Y, Nishi S, Munekata M (2009) Development of novel covered stents using salmon collagen. *J Artif Organs* 12:61–66. <https://doi.org/10.1007/s10047-008-0446-z>
- Nagai N, Nakayama Y, Zhou YM, et al (2008) Development of salmon collagen vascular graft: Mechanical and biological properties and preliminary implantation study. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 87:432–439. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31121>
- Nagai N, Yunoki S, Suzuki T, et al (2004) Application of cross-linked salmon atelocollagen to the scaffold of human periodontal ligament cells. *J Biosci Bioeng* 97:389–394. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70224-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70224-8)
- Nakai M, Kageyama N, Nakahara K, Miki W (2006) Phlorotannins as radical scavengers from the extract of *Sargassum ringgoldianum*. *Mar Biotechnol* 8:409–414. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-6168-9>
- Ng HW, Zhang Y, Naffa R, Prabakar S (2020) Monitoring the degradation of collagen hydrogels by collagenase *Clostridium histolyticum*. *Gels* 6:46. <https://doi.org/10.3390/gels6040046>
- Ngadimin KD, Stokes A, Gentile P, Ferreira AM (2021) Biomimetic hydrogels designed for cartilage tissue engineering. *Biomater Sci* 9:4246–4259. <https://doi.org/10.1039/d0bm01852j>
- Nguyen ST, Nguyen HT-L, Truong KD (2020) Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomed Res Ther* 7:3855–3859. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v7i7.614>
- Nielsen PM, Petersen D, Dambmann C (2001) Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J Food Sci* 66:642–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
- Nijhuis WH, Eastwood DM, Allgrove J, et al (2019) Current concepts in osteogenesis imperfecta: Bone structure, biomechanics and medical management. *J Child Orthop* 13:1–11. <https://doi.org/10.1302/1863-2548.13.180190>
- Nitsuwat S, Zhang P, Ng K, Fang Z (2021) Fish gelatin as an alternative to mammalian gelatin for food industry: A meta-analysis. *Lwt* 141:110899. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110899>
- Nostro A, Germanò MP, D'Angelo V, et al (2000) Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol* 30:379–384. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00731.x>

## - O -

- Oh JH, Ahn B-N, Karadeniz F, et al (2019) Phlorofucofuroeckol A from edible brown alga *Ecklonia cava* enhances osteoblastogenesis in bone. *Mar Drugs* 17:543. <https://doi.org/10.3390/md17100543>
- Onofrejeva L, Vařickova J, Klejdus B, et al (2010) Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *J Pharm Biomed Anal* 51:464–470. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.027>

## - P -

- Pallela R, Venkatesan J, Janapala VR, Kim SK (2012) Biophysicochemical evaluation of chitosan-hydroxyapatite-marine sponge collagen composite for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res - Part A* 100:486–495. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33292>
- Parys S, Kehraus S, Krick A, et al (2010) *In vitro* chemopreventive potential of fucophlorethols from the brown alga *Fucus vesiculosus* L. by anti-oxidant activity and inhibition of selected cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry* 71:221–229. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.10.020>
- Pereira CG, Barreira L, da Rosa Neng N, et al (2017) Searching for new sources of innovative products for the food industry within halophyte aromatic plants: *In vitro* antioxidant activity and phenolic and mineral contents of infusions and decoctions of *Crithmum maritimum* L. *Food Chem Toxicol* 107:581–589. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.018>
- Pistollato F, Madia F, Corvi R, et al (2021) Current EU regulatory requirements for the assessment of chemicals and cosmetic products: challenges and opportunities for introducing new approach methodologies. Springer Berlin Heidelberg
- Platania V, Douglas TEL, Zubko MK, et al (2021) Phloroglucinol-enhanced whey protein isolate hydrogels with antimicrobial activity for tissue engineering. *Mater Sci Eng C* 129:112412. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112412>
- Plaza M, Santoyo S, Jaime L, et al (2010) Screening for bioactive compounds from algae. *J Pharm Biomed Anal* 51:450–455. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.016>
- Plouguerné E, Hellio C, Deslandes E, et al (2008) Anti-microfouling activities in extracts of two invasive algae: *Grateloupia turuturu* and *Sargassum muticum*. *Bot Mar* 51:202–208. <https://doi.org/10.1515/BOT.2008.026>
- Prasad A (2021) State of art review on bioabsorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Today Proc* 44:1391–1400. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.622>
- Prat D, Wells A, Hayler J, et al (2016) CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. *Green Chem* 18:288–296. <https://doi.org/10.1039/c5gc01008j>
- Provost M (2016) Valorisation de la fraction protéique des co-produits de saumon : Étude et optimisation. Université de Bretagne Occidentale
- Pugliano M, Vanbellinthen X, Schwinté P, et al (2017) Combined Jellyfish Collagen Type II, Human Stem Cells and Tgf-β3 as a Therapeutic Implant for Cartilage Repair. *J Stem Cell Res* 7:. <https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000382>

## - Q -

- Qu H, Fu H, Han Z, Sun Y (2019) Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds : a review. *RSC Adv* 9:26252–26262. <https://doi.org/10.1039/c9ra05214c>

## - R -

- Radu N, Ghita I, Coman O, Rau I (2010) Therapeutic effect of flavonoids derived from *Plantago* species. *Mol Cryst Liq Cryst* 523:273–281. <https://doi.org/10.1080/15421401003723003>
- Rainha J, Gomes D, Rodrigues LR, Rodrigues JL (2020) Synthetic biology approaches to engineer *Saccharomyces cerevisiae* towards the industrial production of valuable polyphenolic compounds. *Life* 10:56. <https://doi.org/10.3390/life10050056>
- Rajauria G (2018) Optimization and validation of reverse phase HPLC method for qualitative and quantitative assessment of polyphenols in seaweed. *J Pharm Biomed Anal* 148:230–237. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.10.002>
- Rajauria G, Jaiswal AK, Abu-Gannam N, Gupta S (2013) Antimicrobial, antioxidant and free radical-scavenging capacity of brown seaweed *Himanthalia elongata* from Western coast of Ireland. *J Food Biochem* 37:322–335. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2012.00663.x>
- Rao LG, Balachandran B, Rao AV (2008) Polyphenol extract of greens+™ nutritional supplement stimulates bone formation in cultures of human osteoblast-like SaOS-2 cells. *J Diet Suppl* 5:264–282. <https://doi.org/10.1080/19390210802414295>
- Rao LG, Rao AV (2015) Oxidative stress and antioxidants in the risk of osteoporosis — Role of phytochemical antioxidants lycopene and polyphenol-containing nutritional supplements. *Phytochem - Isol Characterisation Role Hum Heal* 247–260. <https://doi.org/10.5772/60446>
- Rasigade JP (2012) Infections osseuses des infections ostéoarticulaires chroniques : rôle des biofilms et de la persistance bactérienne intracellulaire. *La Lett l’infectiologue* 27:110–115
- Rico-Llanos GA, Borrego-González S, Moncayo-Donoso M, et al (2021) Collagen type I biomaterials as scaffolds for bone tissue engineering. *Polymers (Basel)* 13:1–20. <https://doi.org/10.3390/polym13040599>
- Ries PE (1978) Sterile surgical collagen product
- Roberto VP, Surget G, Le Lann K, et al (2021) Antioxidant, mineralogenic and osteogenic activities of *Spartina alterniflora* and *Salicornia fragilis* extracts rich in polyphenols. *Front Nutr* 8:1–12. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.719438>
- Rodrigues D, Silva A, Amorim M, et al (2015) Impact of enzyme- and ultrasound-assisted extraction methods on biological properties of red, brown, and green seaweeds from the central west coast of Portugal. *J Agric Food Chem* 63:3177–3188. <https://doi.org/10.1021/jf504220e>
- Rosa LA De, Moreno-escamilla JO, Rodrigo-garcía J, Alvarez-parrilla E (2019) Phenolic compounds. Elsevier Inc.

## - S -

- Sandsdalen E, Haug T, Stensvåg K, Styrvold OB (2003) The antibacterial effect of a polyhydroxylated fucophlorethol from the marine brown alga, *Fucus vesiculosus*. *World J Microbiol Biotechnol* 19:777–782. <https://doi.org/10.1023/A:1026052715260>
- Sankar Ganesh P, Ravishankar Rai V (2018) Attenuation of *quorum-sensing*-dependent virulence factors and biofilm formation by medicinal plants against antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Tradit*

- Complement Med 8:170–177. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.05.008>
- Santos-sánchez NF, Salas-coronado R, Hernández-carlos B, Villanueva-cañongo C (2019) Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. *Plant Physiol Asp phenolic Compd* 1:1–15
- Santos SAO, Rafael F, Pais ACS, Rocha SM (2019) The quest for phenolic compounds from macroalgae : A review of extraction and identification methodologies. *Biomolecules* 9:847
- Santos SS, Augusto DG, Casaes Alves PA, et al (2018) *Trichoderma asperelloides* ethanolic extracts efficiently inhibit *Staphylococcus* growth and biofilm formation. *PLoS One* 13:1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202828>
- Sathya R, Kanaga N, Sankar P, Jeeva S (2017) Antioxidant properties of phlorotannins from brown seaweed *Cystoseira trinodis* (Forsskål) C. Agardh. *Arab J Chem* 10:S2608–S2614. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.09.039>
- Savasky BM, Mascotti DP, Patel N, Rodriguez-Collazo E (2018) Nutritional and pharmacological effects on oxidative stress in soft tissue and bone remodeling. *J Nutr Metab* 2018:. <https://doi.org/10.1155/2018/4183407>
- Scarpati ML, Delle Monache F (1963) Isolation from *Verbascum sinuatum* of two new glucosides, verbascoside and isoverbascoside. *Ann Chim* 53:356–367
- Schoenwaelder MEA, Clayton MN (1999) The presence of phenolic compounds in isolated cell walls of brown algae. *Phycologia* 38:161–166. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-38-3-161.1>
- Schoof H, Apel J, Heschel I, Rau G (2001) Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges. *J Biomed Mater Res* 58:352–357. <https://doi.org/10.1002/jbm.1028>
- Shannon E, Abu-Ghannam N (2016) Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Mar Drugs* 14:81. <https://doi.org/10.3390/md14040081>
- Silva J, Alves C, Freitas R, et al (2019) Antioxidant and neuroprotective potential of the brown seaweed *Bifurcaria bifurcata* in an *in vitro* Parkinson's disease model. *Mar Drugs* 17:85. <https://doi.org/10.3390/md17020085>
- Silva TH, Moreira-Silva J, Marques ALP, et al (2014) Marine origin collagens and its potential applications. *Mar Drugs* 12:5881–5901. <https://doi.org/10.3390/md12125881>
- Silvipriya KS, Krishna Kumar K, Bhat AR, et al (2015) Collagen: Animal sources and biomedical application. *J Appl Pharm Sci* 5:123–127. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50322>
- Singh IP, Bharate SB (2006) Phloroglucinol compounds of natural origin. *Nat Prod Rep* 23:558–591. <https://doi.org/10.1039/b600518g>
- Sionkowska A, Adamiak K, Musial K, Gadomska M (2020) Collagen based materials in cosmetic applications: A review. *Materials (Basel)* 13:4217. <https://doi.org/10.3390/MA13194217>
- Song E, Yeon Kim S, Chun T, et al (2006) Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials* 27:2951–2961. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.015>
- Stachel I, Schwarzenbolz U, Henle T, Meyer M (2010) Cross-linking of type I collagen with microbial transglutaminase: Identification of cross-linking sites. *Biomacromolecules* 11:698–705. <https://doi.org/10.1021/bm901284x>
- Stiger-Pouvreau V, Bourgougnon N, Deslandes E (2016) Carbohydrates from seaweeds. Elsevier Inc.

- Stiger-Pouvreau V, Guerard F (2018) Bio-inspired molecules extracted from marine macroalgae: A new generation of active ingredients for cosmetics and human health. *Blue Biotechnol Prod Use Mar Mol* 2:709–746
- Stiger-Pouvreau V, Jégou C, Cérantola S, et al (2014) Phlorotannins in Sargassaceae species from Brittany (France): Interesting molecules for ecophysiological and valorisation purposes
- Stiger V, Deslandes E, Payri CE (2004) Phenolic contents of two brown algae, *Turbinaria ornata* and *Sargassum mangarevense* on Tahiti (French Polynesia): Interspecific, ontogenic and spatio-temporal variations. *Bot Mar* 47:402–409. <https://doi.org/10.1515/BOT.2004.058>
- Subhan F, Hussain Z, Tauseef I, et al (2020) A review on recent advances and applications of fish collagen. *Crit Rev Food Sci Nutr* 61:1027–1037. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1751585>
- Sun L, Zhou R, Sui J, Liu Y (2018) Simultaneous preparation of salidroside and p-tyrosol from *Rhodiola crenulata* by DIAION HP-20 macroporous resin chromatography combined with silica gel chromatography. *Molecules* 23:1602. <https://doi.org/10.3390/molecules23071602>
- Sun X, Li X, Shen X, et al (2021) Recent advances in microbial production of phenolic compounds. *Chinese J Chem Eng* 30:54–61. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.09.001>
- Sundar G, Joseph J, Prabhakumari C, et al (2020) Natural collagen bioscaffolds for skin tissue engineering strategies in burns: a critical review. *Int J Polym Mater Polym Biomater* 70:593–604. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1740991>
- Surget G, Roberto VP, Le Lann K, et al (2017) Marine green macroalgae: a source of natural compounds with mineralogenic and antioxidant activities. *J Appl Phycol* 29:575–584. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0968-3>
- Surget G, Stiger-Pouvreau V, Le Lann K, et al (2015) Structural elucidation, *in vitro* antioxidant and photoprotective capacities of a purified polyphenolic-enriched fraction from a saltmarsh plant. *J Photochem Photobiol B Biol* 143:52–60. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.12.018>
- Szilvassy SJ (2003) The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 34:446–460. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2003.06.004>

## - T -

- Tanniou A, Serrano Leon E, Vandanjon L, et al (2013) Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model. *Talanta* 104:44–52. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.088>
- Tanniou A, Vandanjon L, Incera M, et al (2014) Assessment of the spatial variability of phenolic contents and associated bioactivities in the invasive alga *Sargassum muticum* sampled along its European range from Norway to Portugal. *J Appl Phycol* 26:1215–1230. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0198-x>
- Tarasco M, Cordelières FP, Cancela ML, Laizé V (2020) ZFBONE: An ImageJ toolset for semi-automatic analysis of zebrafish bone structures. *Bone* 138:115480. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115480>
- Tarasco M, Laizé V, Cardeira J, et al (2017) The zebrafish operculum: A powerful system to assess osteogenic bioactivities of molecules with pharmacological and toxicological relevance. *Comp Biochem Physiol Part -*

C Toxicol Pharmacol 197:45–52. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.04.006>

Targett NM, Arnold TM (1998) Minireview—predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. *J Phycol* 34:195–205

Tasse J, Cara A, Saglio M, et al (2017) A steam-based method to investigate biofilm. *Sci Rep* 8:1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31437-y>

Tathe A, Ghodke M, Nikalje AP (2010) A brief review: Biomaterials and their application. *Int J Pharm Pharm Sci* 2:19–23

Tetko I V., Bruneau P, Mewes HW, et al (2006) Can we estimate the accuracy of ADME-Tox predictions? *Drug Discov Today* 11:700–707. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.06.013>

Tian Z, Liu W, Li G (2016) The microstructure and stability of collagen hydrogel cross-linked by glutaraldehyde. *Polym Degrad Stab* 130:264–270. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.06.015>

Tierney MS, Smyth TJ, Hayes M, et al (2013) Influence of pressurised liquid extraction and solid – liquid extraction methods on the phenolic content and antioxidant activities of Irish macroalgae. *Int J Food Sci Technol* 48:860–869. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12038>

Tokali FS, Taslimi P, Demircioğlu İH, et al (2022) Novel phenolic Mannich base derivatives: synthesis, bioactivity, molecular docking, and ADME-Tox Studies. *J Iran Chem Soc* 19:563–577. <https://doi.org/10.1007/s13738-021-02331-8>

Torre E (2017) Molecular signaling mechanisms behind polyphenol-induced bone anabolism. *Phytochem Rev* 16:1183–1226. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9529-x>

## - U -

Underwood A, Underwood A, Underwood A (1997) Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance

Uriarte-Montoya MH, Arias-Moscoso JL, Plascencia-Jatomea M, et al (2010) Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle collagen: Extraction, characterization, and potential application in the preparation of chitosan-collagen biofilms. *Bioresour Technol* 101:4212–4219. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.008>

## - V -

Van Vlierberghe S, Vanderleyden E, Boterberg V, Dubruel P (2011) Gelatin functionalization of biomaterial surfaces: Strategies for immobilization and visualization. *Polymers (Basel)* 3:114–130. <https://doi.org/10.3390/polym3010114>

Vasavi HS, Arun AB, Rekha PD (2016) Anti-*quorum sensing* activity of flavonoid-rich fraction from *Centella asiatica* L. against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Microbiol Immunol Infect* 49:8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.03.012>

Vasavi HS, Arun AB, Rekha PD (2013) Inhibition of *quorum sensing* in *Chromobacterium violaceum* by *Syzygium cumini* L. and *Pimenta dioica* L. *Asian Pac J Trop Biomed* 3:954–959. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60185-9](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60185-9)

Vats A, Tolley NS, Polak JM, Gough JE (2003) Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: A review of clinical

- applications. Clin Otolaryngol 28:165–172. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2273.2003.00686.x>
- Vernejoul M-C De, Marie P (1993) Cellules osseuses et remodelage osseux. médecine/sciences 9:1192–1203
- Vimalraj S (2020) Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. Gene 754:144855. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144855>
- Vissers AM, Caligiani A, Sforza S, et al (2017) Phlorotannin composition of *Laminaria digitata*. Phytochem Anal 28:487–495. <https://doi.org/10.1002/pca.2697>
- Vuorio E, De Crombrughe B (1990) The family of collagen genes. Annu Rev Biochem 59:837–872. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.59.070190.004201>

## - W -

- Walsh PJ, McGrath S, McKelvey S, et al (2019) The osteogenic potential of brown seaweed extracts. Mar Drugs 17:141. <https://doi.org/10.3390/md17030141>
- Wan Y, Zou B, Zeng H, et al (2016) Inhibitory effect of verbascoside on xanthine oxidase activity. Int J Biol Macromol 93:609–614. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.022>
- Wang HMD, Li XC, Lee DJ, Chang JS (2017) Potential biomedical applications of marine algae. Bioresour Technol 244:1407–1415. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.198>
- Wang ZR, Cui Y, Qiu ZY (2019) Biomimetic mineralized collagen biocompatibility. Elsevier Ltd
- Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, et al (2009) Oxidative stress in bone remodelling and disease. Trends Mol Med 15:468–477. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.08.004>

## - X -

- Xia Z, Yu X, Jiang X, et al (2013) Fabrication and characterization of biomimetic collagen-apatite scaffolds with tunable structures for bone tissue engineering. Acta Biomater 9:7308–7319. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.038>

## - Y -

- Yang G, Xiao Z, Ren X, et al (2016) Enzymatically crosslinked gelatin hydrogel promotes the proliferation of adipose tissue-derived stromal cells. PeerJ 4:1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.2497>
- Yang L, Zhang B, Liu J, et al (2019) Protective effect of acteoside on ovariectomy-induced bone loss in mice. Int J Mol Sci 20:2974. <https://doi.org/10.3390/ijms20122974>
- Yi JB, Kim YT, Bae HJ, et al (2006) Influence of transglutaminase-induced cross-linking on properties of fish gelatin films. J Food Sci 71:E376–E383. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00191.x>
- Yuan Y, Zhang J, Fan J, et al (2018) Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four economic brown macroalgae species and evaluation of their antioxidant activities and inhibitory effects on  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, pancreatic lipase and tyrosinase. Food Res Int 113:288–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.021>
- Yunoki S, Nagai N, Suzuki T, Munekata M (2004) Novel biomaterial from reinforced salmon collagen gel prepared



by fibril formation and cross-linking. J Biosci Bioeng 98:40–47. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70240-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70240-6)

## - Z -

- Zamani Y, Amoabediny G, Mohammadi J, et al (2021) Increased osteogenic potential of pre-osteoblasts on three-dimensional printed scaffolds compared to porous scaffolds for bone regeneration. Iran Biomed J 25:78–87. <https://doi.org/10.29252/ibj.25.2.78>
- Zeng S, Yin J, Yang S, et al (2012) Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of cobia (*Rachycentron canadum*). Food Chem 135:1975–1984. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.086>
- Zeng X, Guo F, Ouyang D (2020) A review of the pharmacology and toxicology of aucubin. Fitoterapia 140:104443. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104443>
- Zeugolis DI, Paul GR, Attenburrow G (2009) Cross-linking of extruded collagen fibers-A biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications. J Biomed Mater Res - Part A 89:895–908. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32031>
- Zhang N, Ying M, Wu Y, et al (2014) Hyperoside, a flavonoid compound, inhibits proliferation and stimulates osteogenic differentiation of human osteosarcoma cells. PLoS One 9:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098973>
- Zhang Q, Wang Q, Lv S, et al (2016) Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Food Biosci 13:41–48. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.005>
- Zhang R, Yuen AKL, Magnusson M, et al (2018) A comparative assessment of the activity and structure of phlorotannins from the brown seaweed *Carpophyllum flexuosum*. Algal Res 29:130–141. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.027>
- Zhao L, Li X, Zhao J, et al (2016) A novel smart injectable hydrogel prepared by microbial transglutaminase and human-like collagen: Its characterization and biocompatibility. Mater Sci Eng C 68:317–326. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.108>
- Zhao Q, Yu X, Zhou C, et al (2020) Effects of collagen and casein with phenolic compounds interactions on protein *in vitro* digestion and antioxidation. Lwt 124:109192. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109192>
- Zhou J, Gullón B, Wang M, et al (2021) The application of supercritical fluids technology to recover healthy valuable compounds from marine and agricultural food processing by-products: A review. Processes 9:357. <https://doi.org/10.3390/pr9020357>
- Zolotareva EK, Mokrosnop VM, Stepanov SS (2019) Polyphenol compounds of macroscopic and microscopic algae. Int J Algae 21:
- Zubia M, Fabre MS, Kerjean V, et al (2009) Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. Food Chem 116:693–701. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.025>





---

# ANNEXES

---

## **Annexe 1.** Présentation des axes et des partenaires du projet BLUEHUMAN.

### Les axes du projet BLUEHUMAN :

#### *Partie communication et valorisation*

- Axe 1** Coordination du projet → partenaires 1 à 13  
**Axe 2** Communication du projet → tous les partenaires  
**Axe 3** Capitalisation → tous les partenaires

#### *Partie scientifique*

- Axe 4** Biomatériaux d'origine marine pour l'ingénierie tissulaire → partenaires 1, 4, 5, 6, 9, 10, 11 et 12  
**Axe 5** Dispositifs médicaux → partenaires 1, 4, 5, 8, 9, 11 et 12  
**Axe 6** Ingrédients marins pour les produits cosmétiques, bien-être et santé → partenaires 3 à 7

### Les partenaires BLUEHUMAN :

#### 1 – 3B's Research Group - Université de Minho (Portugal) – Coordinateur du projet

Le groupe de recherche 3B's (biomatériaux, biodégradables et biomimétiques) multidisciplinaire travaille à l'interface de la biotechnologie, de la biologie, de l'ingénierie biomédicale et de la science des matériaux. Ses principaux domaines de recherche comprennent le développement de nouveaux biomatériaux, l'administration de médicaments, l'ingénierie tissulaire, la médecine régénérative, la nanomédecine, les modèles de maladie *in vitro* et l'isolement et la différenciation des cellules souches. Son **rôle dans le projet BLUEHUMAN** est d'intervenir sur la formulation de biomatériaux utilisant des composés d'origine marine, leur caractérisation et l'évaluation de leurs performances en tant que systèmes potentiels pour des recherches ultérieures sur la médecine régénérative ou en tant que dispositifs médicaux potentiels. <https://www.3bs.uminho.pt/>

#### 2 – Fondation CETMAR (Espagne)

Le CETMAR (Centre de technologie marine) est une fondation publique qui travaille à l'amélioration de l'environnement marin, de ses ressources et de tous les secteurs concernés, en encourageant l'innovation et la durabilité environnementale, sociale et économique aux échelles locale, nationale, européenne et internationale. Son **rôle dans le projet BLUEHUMAN** est d'apporter un soutien au leader pour la coordination et la communication entre tous les partenaires ainsi que la communication externe en maintenant à jour le site et les médias sociaux du projet. Le CETMAR collabore avec les partenaires pour la capitalisation de leur recherche. <https://cetmar.org/>

### 3 – CIIMAR - Université de Porto (Portugal)

Le CIIMAR (Centre interdisciplinaire de recherche marine et environnementale) est une institution de recherche et de formation qui travaille à la frontière de la connaissance et de l'innovation en matière d'océan. Il encourage une approche intégrée de l'océan et des zones côtières en favorisant la compréhension et la connaissance des dynamiques biologiques, physiques et chimiques de ces environnements, ainsi que, l'impact des activités naturelles et humaines, dans le but d'élucider les liens entre ces processus. Promouvant le capital naturel et la gestion durable des ressources marines par la surveillance de la santé des écosystèmes, l'optimisation de l'aquaculture et l'exploitation biotechnologique des ressources pour des applications environnementales et en santé humaine. Son **rôle dans le projet BLUEHUMAN** est de fournir des fractions organiques obtenues à partir de la biomasse de cyanobactéries à d'autres partenaires, afin d'être testées pour différentes activités biologiques. En outre, le CIIMAR teste les extraits et les fractions générés par le consortium dans ses propres essais anti-obésité. <https://www2.ciimar.up.pt/>

### 4 – IIM-CSIC - Conseil national de la recherche espagnol (Espagne)

L'IIM (Institut de recherche marine) appartient au Conseil national de la recherche espagnol (CSIC) et se concentre sur le développement d'une recherche intégrée et multidisciplinaire en sciences marines dans les domaines de l'océanographie, l'écologie et les ressources marines, les biotechnologies et l'aquaculture, ainsi que les sciences et technologies de l'alimentation. Son **rôle dans le projet BLUEHUMAN** est de produire des composés d'origine marine (glycosaminoglycane, collagène et dérivés) présentant différentes caractéristiques physico-chimiques (poids moléculaires, etc.) utiles pour les différentes applications décrites dans la proposition. Ils interviennent dans la réticulation chimique du collagène de poissons cartilagineux pour développer des hydrogels à des fins de thérapies du cartilage : formulation de mélanges de collagène et de sulfate de chondroïtine (cicatrisation des plaies et encapsulation des cellules souche), développement d'échafaudages de collagène de requin et de bioapatite (régénération osseuse), et la production de nanoparticules pour délivrer de l'acide hyaluronique et du collagène (applications cosmétiques). <http://www.iim.csic.es/>

### 5 – LEMAR - Université de Bretagne Occidentale (France)

Le LEMAR (Laboratoire des sciences de l'environnement marin) est un laboratoire interdisciplinaire qui conduit des travaux sur des thématiques de recherche fondamentale ou appliquée dans les domaines des sciences marines, contribue à atteindre les objectifs du développement durable, apporte des innovations en lien avec le monde économique et la politique publique, et s'engage dans les formations interdisciplinaires du domaine des sciences de la mer et du littoral. Son **rôle dans le projet BLUEHUMAN** est de développer des matériaux par optimisation des réactions de réticulation assistées par des enzymes de collagène de type I de saumon afin d'améliorer ses propriétés mécaniques et

structurelles, ainsi que de préparer des fractions enrichies en polyphénols à partir d'algues et de halophytes en utilisant des techniques innovantes vertes afin de fournir des molécules caractérisées bioactives aux partenaires (ostéogéniques, pro-minéralogéniques, antibactériennes et/ou antifouling).  
<https://www-ium.univ-brest.fr/lemar/>

#### 6 – YSLAB (France)

YSLAB est une société par actions simplifiée (SAS) développant des formules innovantes adaptées aux besoins du consommateur autour de l'efficacité et de la sécurité. YSLAB privilégie la recherche sur les ingrédients marins pour les intégrer dans ses formulations avec un suivi analytique tout au long du cycle de vie du produit par la réalisation d'analyses libératoires et le suivi de stabilité. Son **rôle dans le projet BLUEHUMAN** est de fournir différents lots de collagène de peau saumon aux partenaires après analyse de leur structure et leur conformité microbiologique et de participer à l'évaluation toxicologique et certaines activités biologiques (activité antioxydante, impact sur les voies d'inflammation, mécanismes de guérison ...). Ils prennent en compte l'environnement réglementaire pour faciliter l'accès au marché et formuler des produits. <http://yslab.fr/>

#### 7 – BIOSKEL – Université d'Algarve (Portugal)

BIOSKEL est un laboratoire de biologie comparée, adaptative et fonctionnelle du squelette du Centre des sciences marines (CCMAR) qui travaille sur différents aspects de la biologie du squelette des vertébrés, y compris l'expression et la régulation des gènes, en utilisant des animaux modèles (tels que le poisson zèbre, les poissons téléostéens marins et les rongeurs) ou des outils *in vitro* tels que les lignées cellulaires ostéo-chondroblastiques ou embryonnaires de poisson développées dans leur laboratoire. Son **rôle dans le projet BLUEHUMAN** est d'analyser les capacités des extraits produits par les autres partenaires à stimuler la minéralisation *in vitro* et à favoriser la formation osseuse chez des larves en développement et adultes de poissons zèbres. <http://bioskel.ccmarmar.ualg.pt/>

#### 8 – Université de Vigo (Espagne)

L'université de Vigo met un accent considérable sur les activités de Recherche et Développement par le biais de nombreux projets financés en interne, ainsi que par le biais de ses différents services et centres de recherche. Son **rôle dans le projet BLUEHUMAN** est la production et la capitalisation des dispositifs médicaux à partir de biocéramiques extraites des déchets marins afin de produire des échafaudages pour la régénération osseuse et des dispositifs pour les thérapies du tissu osseux.  
<https://www.uvigo.gal/>

#### 9 – Tissue Engineering Research Group - Collège royal des chirurgiens (Irlande)

Le département d'anatomie et de médecine régénérative enseigne l'anatomie, la structure du corps humain et la biologie. Il regroupe des diplômés en médecine, en soins infirmiers, en physiothérapie,

en sciences et en ingénierie et possède des qualifications post-universitaires en anatomie, en biologie, en bio-ingénierie, en enseignement médical, en soins infirmiers, en radiologie et en chirurgie. Son **rôle dans le projet BLUEHUMAN** se concentre sur la fabrication de biomatériaux marins (collagène et chondroïtine) pour l'ingénierie tissulaire et de composites marins tri-couches pour les dispositifs médicaux fonctionnels. <https://www.rcsi.com>

#### 10 – Molecular Materials Research Group - Centre chimique de Madère (Portugal)

Le Molecular Materials Research Group réalise des études interdisciplinaires sur la préparation et la caractérisation (physique, chimique et biologique) de nouveaux types de matériaux moléculaires et polymériques contenant des métaux aux propriétés électroniques et biomédicales améliorées. Il possède une expertise dans la synthèse et la caractérisation des matériaux organométalliques pour les applications optoélectroniques, l'électrochimie des polymères conducteurs et les biomatériaux/génie tissulaire. Son **rôle dans le projet BLUEHUMAN** est de fonctionnaliser des biomatériaux avec des dispositifs de libération pour la régénération du cartilage. Le groupe développe des vecteurs à l'échelle nanométrique pour l'administration de protéines/gènes qui dirigent la régénération du cartilage dans les échafaudages. <https://cqm.uma.pt/>

#### 11 – Jellagen (Royaume-Uni)

Jellagen est une entreprise de biotechnologies marines qui fabrique du collagène de type 0 pour des applications médicales et en recherche scientifique. Elle souhaite la construction de sources durables pour les biomatériaux qui ne comportent pas les risques pour l'environnement et la santé humaine des sources de collagène traditionnelles. Son **rôle dans le projet BLUEHUMAN** est de fournir du collagène de méduse aux partenaires et de contribuer à la création et au développement du produit, ainsi qu'à la formulation et au support. <https://jellagen.co.uk/>

#### 12 – Surgacoll (Irlande)

Son **rôle dans le projet BLUEHUMAN** est de rechercher et de développer la fabrication d'une gamme de biomatériaux composites caractérisés à base de biomatériaux d'origine marine (collagène et/ou phosphates de calcium de requin) pour la régénération osseuse. Ils participent à la fonctionnalisation de leur biomatériaux en utilisant de nouvelles biomolécules identifiées fournies par des partenaires pour qu'elles soient délivrées de manière durable. Ils développent des biomatériaux tri-couches pour la régénération des défauts ostéochondraux (os et cartilage) et évaluent leur compatibilité avec les tissus ciblés. <https://surgacoll.com/>

#### 13 – Groupement européen de coopération territoriale Galice-Nord du Portugal (Espagne)

Le GNP-AECT est une entité dont l'objectif est de favoriser la coopération territoriale et transnationale avec des relations de haut niveau avec l'administration publique. Son **rôle dans le projet BLUEHUMAN**



est d'être responsable de la mise en œuvre de la capitalisation en collaboration avec tous les partenaires. <https://www.gnpaect.eu/>

Les associés BLUEHUMAN :

14 – Agence galicienne de l'innovation (Espagne)

15 – Agence nationale de recherche. Dép. Politiques d'innovation (Portugal)

16 – Agence d'investigation de l'État (Espagne)



**Titre :** Approche innovante pour l'ingénierie tissulaire : développement d'un biomatériau à base de collagène réticulé de saumon et de polyphénols bioactifs issus de macrophytes marins.

**Mots clés :** Biomaterériau collagénique, réticulation enzymatique, polyphénols, bioactivité, médecine régénérative, procédé écoresponsable

**Résumé :** L'industrie alimentaire des produits de la mer génère une quantité importante de coproduits riches en molécules valorisables (e.g. collagène). Cette protéine majeure des tissus conjonctifs est utilisée en ingénierie tissulaire osseuse pour développer des biomatériaux imitant la trame organique tissulaire. L'objectif de cette thèse est de valoriser le collagène issu de peaux de saumons atlantiques (*Salmo salar*), en démontrant son potentiel sous forme de biomatériau renforcé par une réticulation enzymatique avec la transglutaminase microbienne. Ce collagène réticulé a été comparé à du collagène de porc réticulé et à une réticulation chimique par le glutaraldéhyde (valeurs de référence). Ainsi, le biomatériau réticulé développé a présenté des propriétés mécaniques doses-dépendantes, comparables à celles des références, suite à l'action de l'enzyme. Dans un second temps, des composés phénoliques, issus de macrophytes

marins, aux propriétés ostéogéniques et antibactériennes ont été recherchés en vue d'être intégrés au sein du biomatériau pour stimuler la régénération osseuse et ainsi limiter les infections dans la zone traitée. Deux méthodologies comparatives ont été testées pour l'extraction et la purification des composés phénoliques, une méthode conventionnelle liquide/liquide *versus* une plus écoresponsable prometteuse sur une résine Diaion HP-20. Des composés issus de *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, *Bifurcaria bifurcata* et *Plantago lanceolata* ont démontré les propriétés recherchées, cependant, les deux procédés ont permis l'obtention de différents composés bioactifs. Cette thèse a permis de poser les bases d'un nouveau concept en ingénierie tissulaire osseuse, combinant un hydrogel réticulé de collagène de saumon à des polyphénols de végétaux marins présentant des propriétés antiradicalaires, ostéogéniques et antimicrobiennes.

**Title:** Innovative approach to tissue engineering: development of a biomaterial based on cross-linked salmon collagen and bioactive polyphenols from marine macrophytes.

**Keywords:** Collagen biomaterial, enzymatic cross-linked, polyphenols, bioactivity, regenerative medicine, sustainable process

**Abstract:** The seafood industry generates large quantities of co-products rich in valuable and value-added molecules (e.g. collagen). This major protein of connective tissues is used in bone tissue engineering in order to develop biomaterials mimicking the organic tissue framework. The objective of this thesis is to valorize collagen from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skins by demonstrating its potential as a biomaterial reinforced by enzymatic cross-linking with microbial transglutaminase. This cross-linked collagen was compared to cross-linked porcine collagen and chemical cross-linking with glutaraldehyde (reference values). Thus, the developed cross-linked biomaterial exhibited dose-dependent mechanical properties comparable to the references following the action of the enzyme. In a second step, phenolic compounds, derived from marine

macrophytes, with osteogenic and antibacterial properties were sought to be integrated into the biomaterial to stimulate bone regeneration and limit infections in the treated area. Two comparative methodologies were tested for the extraction and the purification of the phenolic compounds, one conventional liquid/liquid method *versus* one more eco-responsible promising on a Diaion HP-20 resin. Compounds from *Beta vulgaris* subsp. *maritima*, *Bifurcaria bifurcata* and *Plantago lanceolata* demonstrated the targeted properties, however, both processes resulted in different bioactive compounds obtained. This thesis has allowed to lay the foundations of a new concept in bone tissue engineering, combining a cross-linked salmon collagen hydrogel with marine plant polyphenols presenting antiradical, osteogenic and antimicrobial properties.