



HAL
open science

Approches de bioraffinage pour la valorisation d'une biomasse macroalgale : Application à l'espèce *Halopteris scoparia*

Farah Hadjkacem

► To cite this version:

Farah Hadjkacem. Approches de bioraffinage pour la valorisation d'une biomasse macroalgale : Application à l'espèce *Halopteris scoparia*. Biotechnologies. Université Clermont Auvergne; Université de Sfax (Tunisie), 2023. Français. NNT : 2023UCFA0047 . tel-04645776

HAL Id: tel-04645776

<https://theses.hal.science/tel-04645776>

Submitted on 12 Jul 2024

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.

*ÉCOLE DOCTORALE DES
SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE & ENVIRONNEMENT*

THÈSE PRÉSENTÉE
À L'UNIVERSITÉ CLERMONT-AUVERGNE
&
À L'ÉCOLE NATIONALE D'INGÉNIEURS DE SFAX

EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

(SPÉCIALITÉ : GÉNIE BIOLOGIQUE)

PAR

FARAH HADJKACEM

**Approches de bioraffinage pour la valorisation d'une biomasse
macroalgale :**

Application à l'espèce *Halopteris scoparia*

SOUTENUE LE 10 JUILLET 2023

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Mme GHRIBI Dhouha, Professeur, Université de Sfax (Présidente de Jury).

Mme FRUITIER Ingrid, Professeur, Université de la Rochelle (Rapportrice de thèse).

Mme MIRONESCU Monica, HDR, Université de Sibiu (Rapportrice de thèse).

M. MICHAUD Philippe, Professeur, Université Clermont-Auvergne (Examinateur)

Mme ELLEUCH Jihen, HDR, Université de Sfax (Membre Invité).

M. PIERRE Guillaume, MCU HDR, Université Clermont-Auvergne (Directeur de thèse).

M. ABDELKAFI Slim, Professeur, Université de Sfax (Directeur de thèse).

DÉDICACES

JE DEDIE CE TRAVAIL

À

Mes parents Fatma et Kamel

Les raisons de mon existence dont je suis fière de les avoir
Ceux que personne ne peut compenser les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon
éducation et mon bien être.

Que ce travail soit un modeste témoignage de ma grande affection, mon éternel amour
et mon infinie reconnaissance.

Que Dieu vous bénisse et vous accorde bonne santé et longue vie.

À

Mon Marie Omar

À

Ma belle mère et Mon beau père Nafissa et Abdelatif

D'être toujours à mes côtés pour me soutenir et pour m'aider dans la mesure du
possible, mais surtout pour donner du goût à ma vie pour son amour pour sa tendresse,
J'espère qu'il trouve ici le témoignage de mon profond amour, attachement et respect.

Que Dieu le protège.

À

Mes sœurs Rim, que tu trouves ici l'expression de mon grand amour.

À

Nour, son époux Majdi et ses petits Fédi et Taym

Que dieu vous garde unis.

À

Mon frère Nabil et son épouse Aya et ses petits Ilyes et Sami

Que dieu vous garde unis.

À

Toute ma famille

À

Mes chers amis

Merci pour votre amitié et votre soutien.

Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon affection et ma profonde reconnaissance

F. Hadjkacem

REMERCIEMENTS

Voilà la page que nous prenons toujours beaucoup de plaisir à rédiger, même si ce n'est pas la plus facile puisqu' il ne faut oublier personne !

En premier lieu, je tiens à remercier mon Dieu ALLAH qui m'a donné la force et le courage pour achever cette thèse.

C'est avec un grand plaisir que je réserve ces quelques lignes en signe de gratitude et de reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Bien sûr, cette liste ne saurait être exhaustive, et je tiens par avance à m'excuser auprès de ceux que j'aurais oublié.

Je remercie sincèrement mes directeurs de thèse Mr. Slim ABDELKAFI, Professeur, Directeur de l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, et Mr. Guillaume PIERRE pour leurs constantes disponibilités et leur implication tout au long de ce travail. Je les remercie vivement pour leurs qualités humaines, pour avoir cru en mes capacités, pour m'avoir initié, par leurs expériences exceptionnelles au monde des macroalgues. J'ai eu l'immense privilège de bénéficier de leurs connaissances.

Je remercie particulièrement M^{me} Jihen ELLEUCH, Maître assistante à la Faculté des Sciences de Sfax, pour la qualité exceptionnelle de son encadrement, sa disponibilité, ses apports scientifiques indéniables et son aide précieuse. Les conseils qu'elle m'a prodigués m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je tiens vivement à remercier M^{me} Ghribi Dhouha d'avoir accepté de présider ce jury. Je lui exprime ma profonde gratitude pour son apport scientifique, sa gentillesse, et le soutien continu qu'elle m'a procuré tout au long de mon parcours universitaire.

Je tiens à remercier aussi M^{me} FRUITIER Ingrid, Professeur en biochimie à l'Université de la Rochelle et Mme MIRONESCU Monica, Maître de conférence, HDR, en génie biologique à l'Université Lucian Blaga de Sibiu d'avoir accepté de juger ce travail. Les conseils qu'il m'a prodigués m'ont été d'un grand apport.

Je désire également dire un grand « Merci » à M^{lle} Latifa Tounsi et à M^{lle} Oumayma Ghariani pour leur gentillesse, leurs conseils et leurs soutien si précieux tout au long de ma thèse.

J'adresse ma profonde gratitude envers tous les membres de l'unité de Biotechnologie des Algues, le personnel du département de génie biologique à l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax et du département des sciences de la vie à la Faculté des Sciences de Sfax pour leur

accueil si chaleureux, leur sociabilité et leur disponibilité qui ont permis de créer un environnement très agréable et extrêmement favorable au bon déroulement de ce travail.

Je présente également ma sincère gratitude à tous les enseignants de la Faculté des Sciences de Sfax qui ont contribué à ma formation.

Enfin, que toutes les personnes qui ont contribuées de près ou de loin à ce travail trouvent ici ma sincère reconnaissance et mes vifs remerciements.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACES	
REMERCIEMENTS	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX.....	
LISTE DES ÉQUATIONS	
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	
CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES	
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
Partie I: ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	1
I. Les macroalgues.....	11
I.1. Généralités	11
I.2. Modes de reproduction	13
I.3. Classification des macroalgues.....	13
I.3.1. Les Chlorophycées.....	15
I.3.2. Les Rhodophycées	15
I.3.3. Les Phéophycées.....	15
I.3.3.1. Ordre Sphacélariales, familles et classes	15
I.3.3.2. Espèce d'intérêt: <i>Halopteris scoparia</i>	16
I.3.3.3. Classification	17
I.4. Composition des macroalgues	17
I.5. Les macroalgues dans l'Industrie	20
I.5.1. Ressources, production et transformation.....	20
I.5.2. Enjeux écologiques et humains des macroalgues	25
I.5.2.1. Enjeux écologiques des macroalgues	25
I.5.2.2. Enjeux économiques des macroalgues	25
I.5.3. Valorisation et marchés	26
II. Généralités sur les polysaccharides.....	30

II.1. Biochimie des glucides	31
II.1.1 Les polysaccharides d'origine végétale (plantes).....	32
II.1.2. Les polysaccharides d'origine macroalgale.....	38
II.1.2.1. Les polysaccharides de réserve	39
II.1.2.2. Les polysaccharides pariétaux.....	40
II.1.2.3. Les polysaccharides matriciels.....	40
II.1.2.3.1. Les polysaccharides matriciels des algues vertes	41
II.1.2.3.2. Les polysaccharides matriciels des algues rouges.....	41
II.1.2.3.3. Les polysaccharides matriciels des algues brunes.....	43
II.2. Propriétés techno-fonctionnelles des polysaccharides de macroalgues	48
II.2.1. Généralités sur les phycocolloïdes	48
II.2.2. Propriétés physico-chimiques des fucoïdanes	48
II.2.3. Propriétés physico-chimiques des alginates	49
II.3. Propriétés biologiques des polysaccharides des macroalgues.....	50
II.3.1. Généralités sur le potentiel biologique des poly- et oligosaccharides de macroalgues	50
II.3.2. Activités biologiques des fucoïdanes	59
II.3.2.1. Propriétés anticoagulantes et antithrombotiques.....	59
II.3.2.2. Propriétés antioxydantes	60
II.3.2.3. Propriétés antivirales	62
II.3.2.4. Propriétés antitumorales.....	63
II.3.2.5. Propriétés immunomodulatrices.....	64
II.3.2.6. Effets stimulateurs des défenses naturelles des plantes.....	65
II.3.2.7. Autres activités.....	66
II.3.3. Activités biologiques des alginates	67
II.3.3.1. Activités antioxydantes des alginates.....	68
II.3.3.2. Activités antidiabétiques des alginates.....	69
II.3.3.3. Régulation du microbiote intestinal	69

II.3.3.4. Activités immunomodulatrices et antitumorales des alginates	70
III. Pigments.....	72
III.1. Généralités sur les pigments	72
III.2. Classification des pigments	72
III.2.1. Les chlorophylles	72
III.2.2. Les phycobilliprotéines	73
III.2.3. Caroténoïdes.....	73
III.2.3.1. Les fucoxanthines	75
III.2.3.1.1. Généralités sur les fucoxanthines.....	75
III.2.3.1.2. Activités et applications biologiques	76
III.2.3.2. β -carotènes.....	77
IV. Quelles applications potentielles des macroalgues, notamment d'origine tunisienne, en 2023 ?.....	79
IV.1. Lutte contre le diabète	79
IV.2. Domaine de l'énergie.....	85
IV.2.1. Processus de conversion énergétique.....	88
IV.2.1.1. Conversion biochimique	88
IV.2.1.2. Conversion thermique.....	89
IV.2.1.3. Combustion directe	89
IV.2.1.4 Réaction chimique	89
PARTIE II: MATERIEL ET METHODES.....	96
I. Collecte de la macroalgue.....	96
II. Identification moléculaire	96
II.1 Extraction d'ADN	96
II.2. Réaction en chaine par polymérase (PCR).....	97
II.3. Clonage des produits de PCR	99
II.4. Séquençage et analyse des séquences	99
III. Méthodologie de fractionnement et caractérisation des molécules d'intérêt de la macroalgue <i>H.scoparia</i>	99

IV. Extraction des molécules d'intérêts étudiées à partir d' <i>H.scoparia</i>	101
IV.1. Extraction des polysaccharides.....	101
IV.1.1. Extraction et purification des fucoïdanes d' <i>H. scoparia</i> (fraction FHS).....	101
IV.1.2. Extraction et purification des alginates à partie d' <i>H. scoparia</i> (fraction AHS)..	102
IV.2. Extraction des pigments.....	103
IV.2.1. Extraction des carotenoides à partir d' <i>H. scoparia</i>	103
IV.2.2. Purification des fucoxanthine (fraction P-FX).....	104
IV.2.2.1. Chromatographie sur colonne de silice.....	104
IV.2.2.2. Chromatographie sur couche mince	105
IV.2.3. Purification du β -carotène (fraction P-CT).....	105
IV.2.3.1. Chromatographie sur colonne.....	105
IV.2.3.2. Chromatographie sur couche mince	105
V. Caractérisation biochimique générale de la macroalgue (fraction brute RPS) et des co- produits générés pendant les extractions des polysaccharides et des pigments (BP1-PS et BP2- F)	106
V.1. Extraction des carbohydrates totaux	106
V.1.1. Dosage des sucres totaux.....	107
V.1.2. Dosage des sucres réducteurs	107
V.1.3. Dosage des composés phénoliques	107
V.2. Extraction des lipides	108
V.3. Détermination de la teneur en humidité.....	109
V.4. Détermination de taux de cendres brutes	109
V.5. Dosage des éléments minéraux	110
V.6. Dosage des protéines.....	110
VI. Caractérisation biochimique et structurale des fractions enrichies en fucoïdanes (FHS) et en alginates de sodium (AHS).....	111
VI.1. Dosages colorimétriques.....	111
VI.1.1. Dosage des sucres totaux	111
VI.1.2. Dosage des oses neutres et acides	111
VI.1.2.1. Oses neutres	111
VI.1.2.2. Acides uroniques	111

VI.1.3. Dosage des protéines.....	112
VI.1.4. Dosage des groupements sulfates	113
VI.1.5. Dosage des composés phénoliques	113
VI.2. Caractérisation structurale des fractions FHS et AHS.....	113
VI.2.1. Analyse par spectroscopie infrarouge (empreintes)	113
VI.2.2. Composition en monosaccharides.....	114
VI.2.2.1. Dépolymérisation des polysaccharides.....	114
VI.2.2.2. Analyse des monosaccharides par chromatographie ionique couplée à l'ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD).....	114
VI.2.2.3. Analyse des monosaccharides triméthylsilylés par CPG/SM.....	115
VI.2.3. Analyse des liaisons glycosidiques par CPG/SM-IE	116
VI.2.3.1. Méthode de préparation de Réactif NaOH/DMSO.....	117
VI.2.3.2. Etape de méthylation	117
VI.2.3.3. Formation d'AAPM.....	118
VI.2.4. Analyse structurale par résonance magnétique nucléaire RMN	119
VI.3. Quantification, identification et estimation des puretés des fucoxanthines et du β -carotène des fractions P-FX et P-CT.....	120
VI.3.1. Détermination des rendements massiques	120
VI.3.2. Identification et estimation de la pureté par chromatographie en phase liquide à haute performance.....	121
VI.4. Caractérisation physicochimique des fractions enrichies en fucoïdanes (FHS) et alginates (AHS).....	121
VI.4.1. Détermination des grandeurs macromoléculaires en régime dilué par SEC/MALS	121
VI.4.2. Etude des propriétés rhéologiques	122
VI.4.2.1. Mesure de la concentration critique de recouvrement (C*).....	123
VI.4.2.2. Mesure en écoulement	124
VI.4.2.3. Mesure en oscillation.....	126
VII. Evaluation des activités biologiques des polysaccharides (fractions FHS et AHS)	126

VII.1. Activité antioxydante	126
VII.1.1. Activité antiradicalaire.....	127
VII.1.2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)	127
VII.1.3. Pouvoir chélateur du fer	128
VII.1.4. Piégeage des radicaux hydroxyles	128
VII.1.5. Piégeage d'anions superoxydes	129
VII.2. Activité anti-inflammatoire	129
VII.3. Activité anticoagulante.....	130
VII.3.1. Taux de prothrombine	130
VII.3.2. Temps de céphaline (TCA).....	131
VII.4. Activité antivirale	131
VII.4.1. Culture cellulaire	131
VII.4.2. Préparation des suspensions en particules virales (Virus : Herpes simplex)....	131
VII.4.3. Etude de cytotoxicité et de l'activité antivirale par la méthode du neutral red dye	132
VII.5. Activité antidiabétique	133
VII.5.1. Inhibition de l' α -amylase.....	133
VII.5.2. Inhibition de la trypsine	134
VII.6. Activité antibactérienne.....	134
VII.7. Activité élicitrice	135
VII.7.1. Dépolymérisation des alginates de sodium (AHS) préparation des oligo-alginates	135
VII.7.2. Culture des plantes et test d'élicitation.....	135
VII.7.3. Extraction et mesure de l'activité phénylalanine ammonia-lyase (PAL)	136
VII.7.4. Extraction et quantification des composés phénoliques totaux	137
VIII. Production de vecteurs énergétiques à partir des différentes fractions	137
VIII.1. Production de bio-éthanol	137
VIII.2. Production de bio-hydrogène	139
VIII.3. Production de bio-diesel	141
VIII.3.1. Production des lipides	141

VIII.3.2. Extraction des lipides	143
VIII.3.3. Transesterification des lipides	143
VIII.4. Analyse statistique	144
RÉSUMÉ GRAPHIQUE	144
PARTIE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION	145
CHAPITRE 1 :	148
Caractéristiques structurales, propriétés physico-chimiques et biologiques des polysaccharides hydrosolubles extraits de l'algue brune tunisienne <i>H. scoparia</i>	148
ARTICLE 1	154
Primary structural features, physicochemical and biological properties of two water-soluble polysaccharides extracted from the brown Tunisian seaweed <i>H. scoparia</i>	154
CHAPITRE 2 :	155
Production et purification des fucoxanthines et du β -carotènes de <i>H. scoparia</i> et leurs effets sur des enzymes digestives et quelques bactéries pathogènes.....	155
ARTICLE 2	159
Production and purification of fucoxanthins and β -carotenes from <i>H. scoparia</i> and their effects on digestive enzymes and harmful bacteria.....	159
CHAPITRE 3 :	159
Bioconversion de l'algue brune tunisienne <i>H. scoparia</i> : Application à l'énergie	159
ARTICLE 3	163
Bioconversion of the Brown Tunisian Seaweed <i>H. scoparia</i> : Application to Energy.....	163
DISCUSSION GÉNÉRALE	164
I. CARACTÉRISATION STRUCTURALE ET PHYSICO-CHIMIQUES DES FUCOIDANES ET DES ALGINATES EXTRAITS DE LA MACRO-ALGUES BRUNE <i>H. scoparia</i> ET EVALUATION DE LEURS PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE	164
I.1. Extraction et caractérisation des polysaccharides extraits d' <i>H. scoparia</i>	166
I.2. Activités biologiques des fucoïdanes (FHS) et des alginates (AHS)	169
I.2.1. Activités antioxydantes.....	173
I.2.2. Activité anti-inflammatoire.....	174

I.2.3. Activité anticoagulante	174
I.2.4. Activités antidiabétiques.....	176
I.2.5. Activité anti-trypsine	176
I.2.6. Activité antivirale des fucoïdanes.....	178
I.2.7. Test d'élicitation des alginates.....	179
II. PRODUCTION ET PURIFICATION DES FUCOXANTHINES ET DE B-CAROTENES D'<i>H. scoparia</i> ET LEURS EFFETS SUR DES ENZYMES DIGESTIVES ET QUELQUES BACTERIES PATHOGENES.....	181
II.1. Extraction et caractérisation des caroténoïdes à partir d' <i>H. scoparia</i>	181
II.2. Activités biologiques des caroténoïdes	182
II.2.1. Inhibition de l' α -amylase.....	182
II.2.2. Inhibition de la trypsine.....	182
II.2.3. Activité antibactérienne.....	183
III. BIOCONVERSION DE LA MACROALGUE BRUNE TUNISIENNE <i>H. scoparia</i> : APPLICATION A L'ENERGIE.....	184
III.1. Composition biochimique de la macroalgue brune <i>H. scoparia</i>	184
III.2. Production des biocarburants à partir d' <i>H. scoparia</i> et sous-produits d'extractions BP1-PS et BP2-F.....	187
III.2.1. Production de bio-éthanol	187
III.2.2. Production de bio-hydrogène	184
III.2.3. Production de bio-diesel.....	184
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	191
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	196
WEBOGRAPHIES	253
RÉSUMÉ	254
ABSTRACT.....	255

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Site d'échantonnage (Tabarka)	8
Figure 2. Valorisation du potentiel de la macroalgue brune <i>H. scoparia</i>	9
Figure 3. Systèmes pigmentaires des macroalgues en fonction de leur profondeur et longueurs d'ondes d'absorption de leurs pigments	12
Figure 4. Reproduction chez les macroalgues	13
Figure 5. Arbre schématique des eucaryotes montrant les positions phylogénétiques des algues brunes, rouges et vertes	14
Figure 6. Morphologie de <i>H. scoparia</i>	16
Figure 7. Hétérogénéité des métabolites synthétisés par les macroalgues	17
Figure 8. Les différents pigments constituent des appareils photosynthétiques des macroalgues vertes, brunes et rouges.	19
Figure 9. Organisation des pigments de phycobilisome au niveau de la membrane du thylakoïde des macroalgues rouges.	19
Figure 10. Production et récolte des macroalgues dans le monde.	22
Figure 11. Chaîne de transformation et d'utilisation des macroalgues	23
Figure 12. Chaîne de production des macroalgues (source personnelle).	24
Figure 13. Distribution globale des macroalgues brunes	27
Figure 14. Ubiquité des polysaccharides dans le monde vivant, quelques exemples.....	32
Figure 15. Répartition des polysaccharides de la paroi cellulaire	33
Figure 16. Les polysaccharides d'origines végétales (Plante supérieure).	35
Figure 17. Structures de (A) la cellulose et (B) des hémicelluloses.....	36
Figure 18. Structure du xylane.	36
Figure 19. Structure du β -glucane.	36
Figure 20. Structure des différents types de mannanes.	37
Figure 21. Structure des pectines, HG : homogalacturonane, RG : rhamnogalacturonane, XG : xylogalacturonane, AG : arabinogalacturonane.	37
Figure 22. Structure de l'amylose (A) et l'amylopectine (B)	38
Figure 23. Modèles d'organisations des parois cellulaires (A) des macroalgues brunes (B) des macroalgues rouges (C) des macroalgues vertes.....	39
Figure 24. Structure des différents types de laminarines.....	40
Figure 25. Structures des polysaccharides matriciels des macroalgues vertes, rouges et brunes	41
Figure 26. Unités répétitives dans les trois principaux types des carraghénanes présentant un intérêt commercial	42

Figure 27. Structure de l'agarose et de l'agaropectine.....	43
Figure 28. Caractéristiques principales des compositions et polymères extractibles des macroalgues brunes.....	45
Figure 29. Schéma des unités d'acide mannuronique (M) et guluronique (G) (A), une représentation schématique d'une chaîne polymère d'acide alginique constituée de blocs MM, GG et MG (B) et représentation schématique du modèle « boîte à œufs » (C).....	45
Figure 30. Structure générale des fucoïdanes des macroalgues brunes, R peut être fucopyranose, acide glucuronique et groupement sulfate, tandis que la localisation du galactose, mannose, xylose, le rhamnose, l'arabinose et le glucose dans plusieurs types d'espèces d'algues restent inconnus.....	46
Figure 31. Structures des fucoïdanes isolés de <i>Fucus vesiculosus</i> (A) α -(1→2)-L-fucane (B) α -(1→3)-L-fucane.....	47
Figure 32. Potentialités technofonctionels des polysaccharides issus des différences espèces macroalgales.....	50
Figure 33. Applications des alginates.....	51
Figure 34. Mécanisme de coagulation basée l'activation de deux voies : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque qui se rejoignent en une voie commune aboutissant à la formation du complexe de fibrine.....	60
Figure 35. Pouvoir antioxydant des polysaccharides et principales causes de la formation des radicaux libres.....	61
Figure 36. Activités antivirales des fucoïdanes. Les principales étapes du cycle viral se résument en l'attachement du virus, la pénétration et la décapsidation du génome viral, l'expression et la réplication des gènes qui assurent la synthèse des protéines codées par le génome viral et qui permettent sa réplication, l'assemblage des particules virales et la libération de virus.....	62
Figure 37. Activité antitumorale des fucoïdanes. Le fucoïdane induit l'apoptose et inhibe la prolifération cellulaire <i>via</i> les voies de signalisation p38 MAPK/ERK et PI3K/Akt.....	64
Figure 38. Activités immuo-modulatrice des fucoïdanes, Mécanisme d'action du fucoïdane sur l'activation des macrophages et des cellules NK. (A) Le fucoïdane se lie à des récepteurs glycoprotéiques spécifiques au niveau des membranes cellulaires des macrophages et active les MAPK, induisant ainsi l'activation des facteurs de transcription. (B) La libération de des cytokines à partir des macrophages activés telles que l'IL-12, qui peuvent activer les les cellules NK et qui peuvent stimuler davantage l'activation des lymphocytes T <i>via</i> l'IFN- γ	65
Figure 39. Mécanisme de défense chez les plantes. Schéma représentatif des réactions de défense induites suite à l'interactions plante/pathogène ou plante/éliciteur. La reconnaissance d'éliciteurs par les cellules végétales déclenche la production de molécules de signalisation (boîtes vertes), qui activent des voies biochimiques spécifiques à la défense (boîtes roses) ou affectent directement le métabolisme cellulaire (boîtes brunes). NO, oxyde nitrique ; HFA, acide gras hydroxylé ; SA, acide salicylique ; CT,	

coumaroyl tyramine ; FT, féruloyl tyramine ; LOX, lipoxigénase ; AllOS, allène oxyde synthase ; Et, éthylène ; P, perception.	66
Figure 40. Activités des fucoïdanes des macroalgues brunes (source personnelle).	67
Figure 41. Structures des (A) Chlorophylles <i>a</i> et <i>b</i> et (B) de la Chlorophylle <i>c</i>	73
Figure 42. Structures des (A) Phycocyanobiline et (B) Phycoérythrobiline.	73
Figure 43. Classification des caroténoïdes des macroalgues	75
Figure 44. Les isomères de fucoxanthine : all-trans fucoxanthin, 9-cis fucoxanthin, 13-cis fucoxanthin, 13' – cis fucoxanthin	76
Figure 45. Les isomères de β -carotène : all-trans- β -carotène, cis- β -carotène.	78
Figure 46. Mécanisme de régulation de l'hyperglycémie. Inhibition de l' α -amylase et l'hydrolyse de l'amidon par des molécules bioactifs a savoir des polysaccharides ou des pigments.	81
Figure 47. Bioraffinerie des macroalgues	85
Figure 48. Marché des macroalgues	86
Figure 49. Estimation de la demande de l'énergie en 2050.	86
Figure 50. Evolution des sources d'énergie primaire	87
Figure 51. Différentes voies de conversion de la biomasse des macroalgues en énergie	88
Figure 52. Conversion de macroalgue en bioéthanol	90
Figure 53. Différentes voies métaboliques pour la production de bio-hydrogène	94
Figure 54. Mécanisme de transestérification et production de bio-diesel à partir des triglycérides et des acides gras	95
Figure 55. Site d'échantillonnage.	96
Figure 56. Méthodologie de fractionnement d' <i>H. scoparia</i>	100
Figure 57. Méthodologie générale de caractérisation des fractions (RPS / AHS / FHS / PFX / PCT / BP1-PS et BP2-PS).	101
Figure 58. Procédure d'extraction des fucoïdanes et des alginates à partir de la macroalgue brune <i>H. scoparia</i>	103
Figure 59. Procédures d'extraction et de purification des caroténoïdes d' <i>H. scoparia</i>	104
Figure 60. Extraction des pigments et des polysaccharides à partir de RPS et formation des co-produits BP1-PS et BP2-F.	106
Figure 61. Schéma de l'extraction des lipides par soxhlet.	109
Figure 62. Mécanisme général de l'hydrolyse acide des glycosides	116
Figure 63. Mécanisme de triméthylsilylation des <i>O</i> -glycosides	116
Figure 64. Procédure d'obtention des acétates d'alditols partiellement méthylés.	117
Figure 65. Etats d'enchainement des polymères en fonction de la concentration (En solution).	123
Figure 66. Comportements rhéologiques des fluides.	125

Figure 67. Protocole d'explication des activités élicitrices.	136
Figure 68. Position géographique de la Tunisie (a) source : Google Earth), (b) Les pourcentages de la biodiversité macroalgale relative aux trois régions : côte nord, côte est et côte sud.	150
Figure 69. Arbre phylogénétique d' <i>H. scoparia</i> basé sur les séquences des marqueurs 18S (A), LSU (B) et RbcL (C).	165
Figure 70. Objectifs scientifiques et méthodologies de l'extraction à l'exploration des potentiels biologiques des polysaccharides.	191
Figure 71. Intégration et travail d'équipe au cours du projet PHC EXPLORE.	192

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques des amorces utilisées.....	99
Tableau 2. Composition du milieu de culture pour production de bio-éthanol.....	138
Tableau 3. Composition des solutions.....	140
Tableau 4. Composition du milieu de culture pour production de bio-hydrogène.....	141
Tableau 5. Composition du milieu de culture pour production des lipides.....	142
Tableau 6. Solution du milieu de culture « lipide » concentré 100 x (1mL/L).....	143
Tableau 7. Solution du milieu de culture « lipide » concentré 1000 x (1mL/L).....	143
Tableau 8. Temps de rétention des standards d'acides gras.....	144
Tableau 9. Activités biologiques des fucoïdanes en comparaison avec notre étude.....	170
Tableau 10. Activités biologiques des alginates en comparaison avec notre étude.....	172

LISTE DES ÉQUATIONS

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2CO_2$ (Eq 1)	91
$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$ (Eq 2)	93
$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par le pigment}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$ (Eq 3)	105
Teneur en lipide = $\frac{\text{Masse du ballon-avec lipide} - \text{Masse du ballon vide}}{\text{Masse de l'échantillon}}$ (Eq 4)	108
% d'humidité = $\frac{(100 - (\text{Creuset avec matière séchée} - \text{Creuset vide}))}{\text{Masse de l'échantillon}} \times 100$ (Eq 5)	109
% cendre = $\frac{(100 - (\text{Creuset avec matière séchée} - \text{Creuset vide}))}{\text{Masse de l'échantillon}} \times 100$ (Eq 6)	109
Teneur en protéines = $14 \times V \times 10^{-3} \times 0,1M \times 100 \times 6,2$ (Eq 7)	110
DO résorcinol = $\alpha ON + \beta OA$ (Eq 8)	112
DO mHBP = $\alpha'[ON] + \beta'[OA] \approx \beta'[OA]$ (la concentration en ON est négligeable (Eq 9)	112
$[OA] = \frac{DO \text{ m-HBP}}{\beta'}$ (Eq 10)	112
$[ON] = [DO \text{ résorcinol} - (\beta \times DO \text{ m-HBP} \beta')]$ α (Eq 11)	112
$FG = \frac{A_I}{A_{II} + A_{III}}$ (Eq 12)	120
$F_{GG} = \frac{A_{III}}{A_{II} + A_{III}}$ (Eq 13)	120
$FM = 1 - F_G$ (Eq 14)	120
$F_{GM} = F_{MG} = F_G - F_{GG}$ (Eq 15)	120
$F_{MM} = F_M - F_{MG}$ (Eq 16)	120
$M/G = \frac{F_M}{F_G} = \frac{1 - F_G}{F_G}$ (Eq 17)	120
$\eta = \frac{\eta_0}{(1 + (K\dot{\gamma})^{1-n})}$ (Eq 18)	123
$\tau = \eta\dot{\gamma}$ (Eq 19)	124
$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$ (Eq 20)	124
$\tau = k \dot{\gamma}^n$ (Eq 21)	125
$\tau = \tau_0 + k \dot{\gamma}^n$ (Eq 22)	125
% d'inhibition de DPPH = $(1 - (\frac{A_{\text{Echantillon}} - A_0}{A_{\text{Contrôle}}})) \times 100$ (Eq 23)	127
% Chélation de Fer = $\frac{(A_{\text{Témoin}} - (A_0 - A_{\text{Echantillon}}))}{A_{\text{Témoin}}} \times 100$ (Eq 24)	128
% d'inhibition radical hydroxyle = $\frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Echantillon}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100$ (Eq 25)	128
% d'inhibition = $\frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Echantillon}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100$ (Eq 26)	129

% d'inhibition = $(1 - (\frac{D}{C})) \times 100$ (Eq 27)	129
Calcul de INR = $(\frac{\text{Temps de Quick échantillon}}{\text{Temps de Quick moyen normal}})^{ISI}$ (Eq 28).....	130
CE(%) = $[\frac{(OD_t)_{HSV} - (OD_c)_{SV}}{(OD_c)_{MOCK} - (OD_c)_{HSV}}] \times 100$ (Eq 29).....	132
Inhibition de α -amylase (%) = $\frac{A_0 - A_{\text{Echantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$ (Eq 30)	133
Inhibition de trypsine (%) = $\frac{A_0 - A_{\text{Echantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$ (Eq 31).....	134
Activité PAL = $\frac{DO_{290} \times 1,4}{9116 \times 1000 \times \text{protein concentration } (\mu\text{g}/\text{mgFM})} \times \text{Facteur de dilution}$ (Eq 32)	136
[Composés phénoliques totaux] (μg d'acide gallique/g MF) = $((DO_{760} \text{ (sans PVPP)} - DO_{760} \text{ (avec PVPP)}) / 0,005) / 0,1) / (\text{mg de MF})$ (Eq 33).....	137

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNr	: ADN ribosomique
ABA	: voie de synthèse de l'acide abscisique
AGV	: Acides gras volatils
AHS	: Alginates extrait d' <i>H. scoparia</i>
AOAC	: Association of Analytical Communities
APTT	: Temps de thromboplastine partielle activée
BHA	: Hydroxyl anisole butylé
BHT	: Butyl hydroxyl Toluène
BP2-F	: Co-produits générés suite à l'extraction des fucoxanthines
BP1-PS	: Co-produits générés suite à l'extraction des polysaccharides
BSA	: Albumine de sérum bovin
BSTFA	: Trimethylsilyl 2,2,2-trifluoro-N-trimethylsilylethanimidate
BASF	: Baden Aniline and Soda Factory
CC₅₀	: Concentration cytotoxique médiane
CD	: Cellules dendritiques
CE₅₀	: Concentration efficace médiane
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
CPG/MS-IE	: Chromatographie Phase Gaz couplée à la Spectrométrie de Masse, par impact électronique
CPS	: Polysaccharides capsulaires

DAP	: Détecteur ampérométrique pulse
DG	: Diglycérides
dNTP	: désoxyribonucléotide triphosphate
DPPH	: 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle
E160	: Colorant alimentaire 160
EPS	: Exopolysaccharides
FCS	: Sérum de veau foetal
FHS	: Fraction enrichie en fucoïdanes extraite de <i>H. scoparia</i>
FID	: La Fédération internationale du diabète
FM	: Les acides mannuroniques
GAG	: Glycosaminoglycanes
HPLC	: Chromatographie en phase liquide à haute performance
HSV	: virus Herpes simple
HSV-1	: virus Herpes simple de type 1
CI₅₀	: Concentration inhibitrice médiane
IL-6	: Interleukine-6
IL-12	: Interleukine-12
ITS	: Espaceur interne transcrit
LPS	: Lipopolysaccharides
LSUr	: Acide ribonucléique ribosomique à grande sous-unité
MEM	: Milieu essential minimum
MG	: Monoglycérides
MTBE	: Méthyl tert-butyl éther

MTT	: Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
MWCO	: Seuil de poids moléculaire ou poids moléculaire d'une molécule retenue à 90% par la membrane
NA	: Virus neuraminidase NA
NO	: Oxyde nitrique
(ODt)hSV	: Absorbance de l'échantillon à tester
(ODc)hSV	: Absorbance du contrôle infecté par le virus (absence de l'échantillon)
(ODc)mOCK	: Absorbance du contrôle (Fausse infection)
Oligo-alginate	: Fractions issus suite à l'hydrolyse partielle des alginates avec du H ₂ O ₂
PAL	: Phénylalanine ammonia-lyase
PCR	: Polymerase Chain Reaction
P-CT	: Fraction enrichie en -carotènes
P-FX	: Fraction enrichie en Fucoxanthines
PVPP	: Polyvinylpolypyrrolidone
PSU	: Unité de salinité dont 1 psu correspond à 1 g de sel par un kg d'eau de la mer
PS	: Polysaccharides
PSS	: Polysaccharides sulfatés
RMN	: Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire
ROS	: Espèces réactives de l'oxygène
Rpm	: Rotation par minute
RPS	: Fraction entière (raw) d' <i>H. scoparia</i>
SEC/MALS	: Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de lumière

TAE	: Tampon de migration (Tris, Acétate, EDTA)
TBHQ	: Tert-butyl hydroxyquinone
TCA	: Temps de céphaline activée
TG	: Triglycérides
TFA	: Acide trifluoroacétique
TLR	: Récepteurs de type Toll
TMCS	: Réactif de silylation
TNF-α	: Facteurs de nécrose tumorale- α
TP	: Prothrombine
TQ	: Temps de Quick

CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS SOUMISES

Hadjkacem, F., Elleuch, J., Aitouguinane, M., Chakou, F., Violeta Ursu, A., Dubessay, P., Bourgougnon, N., Traikia, M., Le Cerf, D., El Alaoui-Talibi, Z., El Modafar, C., Boual, Z., Ould El Hadj, MD., Delattre, C., Michaud, M., Fendri, I., Abdelkafi, S., Pierre, G. (2023). Primary structural features, physicochemical and biological properties of two water-soluble polysaccharides extracted from the brown Tunisian seaweed *Halopteris scoparia*. International Journal of Biological Macromolecules.

Elleuch, J., Drira, M., Ghribi, I., **HadjKacem, F.**, Pierre, G., Khemakhem, H., Michaud, P., Fendri, I & Abdelkafi, S. (2023). Amphora coffeiformis extracellular polymeric substances: potential applications in lead removal. Environmental Technology.

PUBLICATIONS ACCEPTEES

Elleuch, J., **HadjKacem, F.**, H., Amor, F. B., Hadrich, B., Michaud, P., Fendri, I., & Abdelkafi, S. (2021). Extracellular Polymeric Substances (EPS) from *Navicula salinicola*: purification, characterization and potential application for water and wastewater treatment processes. International Journal of Biological Macromolecules, 167, 1491-1498.

Chakou, F., Boual, Z., Didi Ould El Hadj, M., Belkhalifa, H., Bachari, K., El Alaoui-Talibi, Z., El Modafar, C., **Hadjkacem, F.**, Fendri, I., Abdelkafi, S., Traïkia, M., Le cerf, D., Dubessay, P., Delattre, C., Pierre, G., & Michaud, P. (2021). Pharmacological investigations in traditional utilization of Alhagi maurorum Medik. in Saharan Algeria: *in vitro* study of anti-inflammatory and antihyperglycemic activities of water-soluble polysaccharides extracted from the seeds. plants-1482023.

Hadjkacem, F., Pierre, G., Christophe, G., Elleuch, J., Fendri, I., Boual, Z., Didi Ould El Hadj, M., El Alaoui-Talibi 5, Z., El Modafar, C., Dubessay, P., Delattre, C., Michaud, P., and Abdelkafi, S. (2022). Bioconversion of the Brown Tunisian Seaweed *Halopteris scoparia*: Application to Energy. Energies, 15(12), 4342.

Drira, M., Elleuch, J., **Hadjkacem, F.**, Hentati, F., Drira, R., Pierre, G., Gardarin, C., Delattre, C., ElAlaoui-Talibi, Z., El Modafar, M., Michaud, P., Abdelkafi, S., and Fendri, I. (2022). Influence of the sulfate content of the exopolysaccharides from *Porphyridium sordidum* on their elicitor activities on date palm vitroplants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 186, 99-106.

Hadjkacem, F., Elleuch, J., Pierre, G., Fendri, I., Michaud, P and Abdelkafi, S. (2023). Production and purification of fucoxanthins and β -carotenes from *Halopteris scoparia* and their effects on digestive enzymes and harmful bacteria. *Environmental Technology*, 1-30.

COMMUNICATION ORALE

Farah Hadjkacem, Jihen Elleuch, Gwendoline Christophe, Pascal Dubessay, Mounir Traikia, Didier Le cerf, Imen Fendri, Mohamed Didi Ould el-hadj, Zakaria Boual, Christine Gardarin, Zainab El alaoui- talibi, Cherkaoui El modafar, Cédric Delattre, Philippe Michaud, Slim Abdelkafi, Guillaume Pierre / 2021 / Etude structurale et physico-chimique des fucoïdanes et des alginates extraits de l'algue brune : *Halopteris scoparia* / POLYSAC / Sfax, Tunisie, 11-13 Decembre 2021.

Farah Hadjkacem, Jihen Elleuch, Gwendoline Christophe, Pascal Dubessay, Mounir Traikia, Didier Le cerf, Imen Fendri, Mohamed Didi Ould el-hadj, Zakaria Boual, Christine Gardarin, Zainab El alaoui- talibi, Cherkaoui El modafar, Cédric Delattre, Philippe Michaud, Slim Abdelkafi, Guillaume Pierre / 2022 / Etude structurale, physico-chimique et différentes activités biologiques des fucoïdanes et des alginates extraits de l'algue brune Tunisienne : *Halopteris Scoparia* / Conférence : 4^{èmes} journées du PHC Maghreb / Sousse, Tunisie, 7-8 Decembre 2022.

Farah Hadjkacem, Jihen Elleuch, Guillaume Pierre, Imen Fendri, Philippe Michaud, Slim Abdelkafi / 2023 / Extraction and purification of fucoxanthin and β -caroten from the brown macroalgae and their antidiabetic / 32st international congress of the Tunisian Association of biological Sciences / Sousse, Tunisia, 18-20 March 2023.

AFFICHE ⁽²⁾

Farah Hadjkacem, Jihen Elleuch, Pascal Dubessay, Imen Fendri, Mohamed Didi Ould El-Hadj, Zakaria Boual, Christine Gardarin, Zainab El Alaoui-Talibi, Cherkaoui El Modafar, Cédric Delattre, Philippe Michaud, Slim Abdelkafi, Guillaume Pierre / Structural characterization, biological activities and biotechnological applications of water-soluble polysaccharides isolated from the Tunisian brown seaweed: *Halopteris scoparia* / POLYSAC / Sfax, Tunisie, 11-13 Decembre 2021.

Farah Hadjkacem, Slim Abdelkafi, Guillaume Pierre / Etude structurale, tests biologiques et applications biotechnologiques des polysaccharides extraits de l'algues brune : *Halopteris Scoparia* / EDST journée de l'école doctorale de l'Enis / Sfax, Tunisie, 20-22 Mai 2022.

Farah Hadjkacem, Jihen Elleuch, Pascal Dubessay , Imen Fendri , Mohamed Didi Ould El-Hadj, Zakaria Boual, Christine Gardarin, Zainab El Alaoui-Talibi , Cherkaoui El Modafar,

Cédric Delattre, Philippe Michaud, Slim Abdelkafi, Guillaume Pierre / Structural characterization, biological activities and biotechnological applications of water-soluble polysaccharides isolated from the Tunisian brown seaweed : *Halopteris scoparia* / Journée de l'école doctorale / Clermont-Ferrand, France, 7-28 Mai 2021.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La demande actuelle des consommateurs pour les produits naturels a forcé l'évolution des préférences du marché vers l'exploitation des ressources d'origine biologique (Escribano et al., 2023). Dans ce contexte, les plantes ont été largement utilisées et exploitées dans divers secteurs industriels. Les algues sont ainsi considérées comme une ressource naturelle à fort potentiel. Toutefois, elles restent sous-exploitées à l'échelle industrielle notamment dans les pays occidentaux (Mohan et al., 2023). Le marché mondial des macroalgues a été évalué à environ 7 882,6 M USD en 2017 et devrait croître avec un taux de croissance annuel estimé à 8% durant la période 2018-2028 [1]. Des efforts sont fournis pour soutenir l'introduction des produits à base d'algues au regard de leurs propriétés techno-fonctionnelles et physico-chimiques, mais aussi de leurs activités biologiques et leurs bienfaits pour la santé et le bien-être (Losada-Lopez et al., 2021). Les macroalgues ont par exemple été utilisées en tant qu'ingrédients aromatisants ou que substituants du sel, et ont séduit les consommateurs européens. Selon la base de données mondiale de Mintel, durant la période entre 2011 et 2015, la quantité d'aliments et des boissons aromatisées à base de macroalgues (à savoir le Kombu, le Nori et le Wakame) s'est améliorée de 147% sur le marché européen (Mintel et al., 2016). L'Europe est désormais la deuxième région la plus créative du monde en matière d'introduction d'aliments et de boissons incluant des algues (Sorteberg et al., 2019). La commercialisation des algues pour la consommation humaine constitue 83% de la production mondial d'algues. Les asiatiques sont les plus grands consommateurs. Bien qu'il existe un nombre élevé d'espèces de macroalgues approuvées par l'autorité européenne de sécurité des aliments, leur utilisation reste actuellement faible (Commission européenne, 2018). Consommées sous forme fraîche ou séchée, les algues sont riches en différentes molécules, dont les minéraux, les oligo-éléments et les acides gras polyinsaturés à longues chaînes (e.g. acide eicosapentaénoïque), permettant leur consommation en tant que complément alimentaire (El-Beltagi et al., 2017). Elles sont disponibles sous forme de feuilles (Nori), de flocons, de poudre ou d'aliments à valeur ajoutée : on peut par exemple citer leurs utilisations comme substituants de pâtes (*Himanthalia allongées*) ou de bacon (*Palmaria palmata*), de feuilles pour envelopper des rouleaux de sushis ou d'onigiri (*Undaria pinnatifida*), de collations rapides et croustillantes d'assaisonnements dans les soupes, les ragoûts, les vinaigrettes. Elles peuvent aussi être incorporées dans des desserts comme la crème glacée (épaississant) et les nougats espagnols au nori écrasé. Grâce à leur richesse en caroténoïdes, les macroalgues sont également utilisés comme exhausteurs de couleurs naturelles dans l'industrie alimentaire. Les algues sont par exemple la principale source de β -

carotène qui est absorbé par l'organisme dix fois plus efficacement que les pigments synthétiques.

Les propriétés biotechnologiques des produits à base d'algues suscitent donc encore beaucoup d'intérêt en 2023, pour leurs exploitations dans des secteurs économiquement importants incluant les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Pereira et al., 2014). La valeur économique et biologique des macroalgues est largement soutenue par la production des PS hydrosolubles, qualifiés d'hydrocolloïdes ou phycocolloïdes. En raison de leurs propriétés biologiques et techno-fonctionnelles, ces biopolymères sont valorisables dans des domaines très variés allant de marchés de niches (cosmétique, nutraceutique) jusqu'à des applications plus larges (agro-alimentaires, adhésifs, matériaux biosourcés...). Ces biopolymères présentent des structures très variables et complexes dont l'inventaire est par ailleurs relativement incomplet. Encore aujourd'hui, les PS d'origine algale les plus exploités et commercialisés à l'échelle mondiale sont les agars (40 000 tonnes/ans) et les carraghénanes (25 000 tonnes/ans) extraits des macroalgues rouges (Carpena et al., 2022). Les carraghénanes (E407), extractibles sont utilisés comme additifs dans l'industrie alimentaire comme agents épaississant, stabilisant et émulsifiant. Les agars des Rhodophycées (espèces *Pterocladia*, *Gracilaria* et *Gelidium*) sont utilisés comme épaississants alimentaires et comme substituant de la gélatine animale (Cotas et al., 2020). L'agar est aussi utilisé comme biomatériaux d'emballage, substituant biodégradable et durable des plastiques. Les agar-agar (E406) ont été approuvés comme additif alimentaire par la Food and Drugs Administration (FDA) et l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) (Efsa., 2017 ; Cotas et al., 2020). L'alginate (E401) est utilisé comme épaississant ou dans des processus de gélification, sphérification et d'encapsulation (Cikoš et al., 2020). Le phlorotanin, approuvé par l'EFSA, est disponible sur le marché sous le nom de SeaPolynol™ sous forme comestible (Turck et al., 2017). Des fucoïdanes, extraits de *Fucus vesiculosus* et d'*U. pinnatifida* ainsi que des phlorotanins, extraits d'*Ecklonia cava*, sont utilisés comme compléments alimentaires (Lähteenmäki-Uutela et al., 2021). De nos jours, des nombreux produits commerciaux sont à base de macroalgues : (1) Citons l'exemple de cacahuètes enrobées de nori et de wasabi avec 0,07% d'espèces de *Porphyra* de Tomizawa (Chine), (2) de pâtes contenant 1% de *Lithothamnion calcareum* ainsi que quelques autres ingrédients marqués par Sottolestelle (Italie), (3) de boissons de riz et de sorgho avec du calcium et 0,4% de *L. calcareum* sous la marque Alter Eco de France, (4) de riz aux algues contenant 38% de chacun des genres *Palmaria*, *Ulva*, *Porphyra* de marque Miss Algae (France), (5) de ragoût de pois chiches avec 1% de *Laminaria japonica* d'Espagne (Marque : Carlota Organic) (Ashokkumar et al., 2022). Les algues comme *Alaria esculenta*,

Pyropia yezoensis et *Palmaria palmata* sont des ingrédients de nombreuses cuisines européennes (Wells et al., 2017). En tant qu'aliment, les algues sont incluses dans environ 21% de repas consommés au Japon (Zava et al., 2011) alors qu'en Corée du Sud, la consommation d'algues est estimée à environ 255 g/personne/mois en 2009 (Healy et al., 2023).

Les polysaccharides, notamment sulfatés (PSS), dérivés des macroalgues sont des composés d'intérêt utilisés dans l'industrie pharmaceutique (Alam et al., 2021). Les PSS extraits de chlorophytes et de phaeophytes ont montré des activités anticoagulantes similaires à celle de l'héparine (Costa et al., 2010). Le fucoïdane extrait d'*Ascophyllum nodosum* a par exemple été formulé dans un produit pharmaceutique, le ^{99m}technétium-fucoïdane pour le diagnostic moléculaire de l'expression de la P-sélectine dans les maladies cardiovasculaires (Chauvierre et al., 2019).

Certains carraghénanes sont utilisés comme agents laxatif, anticoagulant et excipient dans les formulations pharmaceutiques (Pacheco-Quito et al., 2020). *Gracilaria edulis* a montré des propriétés antidiabétiques, anticoagulantes, anti-inflammatoires, antioxydantes et antiprolifératives (Asghar et al., 2021). Le *Griffithsin* (*Griffithsia*), des ulvanes (espèce de *Ulva*), des fucoïdanes (*Phycophyceae*), des PPS (de *Porphyridium*) sont des composés actifs par exemple contre la COVID-19 (Alam et al., 2021). Des PS extraits de *Saccharina japonica* ont montrés des propriétés antivirales contre ce virus (Kwon et al., 2020). Les ulvanes sulfatés (*Ulva* sp.) peuvent être utilisés comme matériau résorbable dans l'ingénierie tissulaire (Kikionis et al., 2021). En outre, les alginates sont utilisés comme excipient dans les formulations pharmaceutiques des médicaments. Ils sont également utilisés comme bio-adhésif dans les produits de soin des plaies ou dans la formulation de bio-encre pour l'impression 3D. Les médicaments gastro-intestinaux (*Gaviscon*) contiennent des alginates qui neutralisent les acides gastriques, préviennent le reflux, soulagent les symptômes des brûlures de l'estomac et de l'indigestion (Mollah et al., 2021).

Par ailleurs, d'autres métabolites présentent des propriétés significatives. Les phlorotannins d'*E. cava* et d'*A. nodosum* ont respectivement des propriétés antioxydantes et antidiabétiques. Ce sont également des agents chimio-protecteurs puissants contre la photo-carcinogénèse (Dutot et al., 2021). Les acides aminés analogues de la mycosporine (AAM) extraits d'*Asparagopsis armata* (ASPARAGETM) ont été incorporés dans des lotions revendiquant des propriétés « anti-âge » (López-Hortas et al., 2021). Le marché mondial des produits cosmétiques devrait atteindre 463,5 milliards USD d'ici 2027 (Morganti et al., 2021). Une grande variété des métabolites extractibles des macroalgues présentent des propriétés cosmétiques, notamment hydratantes, éclaircissantes pour la peau, lipolytique et anti-âge, ainsi

potentiellement exploitables. Les AAM de *Porphyra umbilicalis* sont utilisés dans les produits de protection solaire et sont disponibles sous différentes marques commerciales dont Helionori (Gelyma, Marseille, France) (Rosic et al., 2023). L'extrait hydroglycolique d'*U. lactuca* est l'ingrédient principal du Chlorofiltrat Ulva HG (CODIF, Saint-Malo, France). Les extraits de *Gracilaria* sont des ingrédients du savon hydrogel de Sealaria (Kfar Hess, Israël), des masques faciaux de Balinique (Miami, FL, USA) ou encore de la crème hydratante de Thalasso (Rosa Gfar, Stamford, CT, USA). Les extraits d'algues se trouvent également dans d'autres produits cosmétiques à savoir, Sealgae (Lusalgae, Figueira da Foz, Portugal), la solution naturelle (Flemington, NJ, USA), Gelcarin (Dupont nutrition biosciences, Wilmington, DEL, USA), l'arôme gel d'algues shoppe (Jan Benham cosmetics, Winschoten, Pays-Bas), ECKLEXT BG (NOF Group, Tokyo, Japon) (Morais et al., 2021).

En juin 2022, BASF (Badische Anilin et Soda Fabrik) a lancé un nouveau biopolymère, « Verdessence Rice Touch », spécialement conçu pour les produits cosmétiques naturels et biologiques. Verdessence Rice Touch est un ingrédient idéal et peut être utilisé dans les cosmétiques de couleur, les produits de soin de la peau et les crèmes solaires [2].

Les macroalgues sont utilisées essentiellement dans l'alimentation des populations asiatiques. En 1999, chaque Japonais consomme 1,6 kg/an (Fleurence et al., 1999). En 2016, la production des macroalgues fraîches a atteint environ 30 millions de tonnes pour un chiffre d'affaires de 8 milliards d'euros en Asie (Kumar et al., 2021). Par ailleurs, l'incorporation des macroalgues dans le cadre d'une alimentation quotidienne normale a été corrélée à une incidence plus faible et à une diminution du risque de mortalité pour des maladies telles que l'hyperlipidémie, les maladies coronariennes et d'autres maladies cardiovasculaires (Chichibu et al., 2021).

L'exploitation des macroalgues s'étend à l'alimentation animale en tant que source riche en glucides, protéines, minéraux, vitamines et fibres alimentaires, avec des profils d'acides aminés relativement bien équilibrés et un mélange unique de composés bioactifs. Les macroalgues stimulent la production laitière et améliorent la qualité de la nourriture des poissons en aquaculture (Healy et al., 2023). Ainsi, le marché mondial des additifs pour l'alimentation animale et des suppléments nutritionnels a été évaluée à 54 milliards USD en 2018 et devrait générer un revenu net de 64 milliards USD d'ici 2025 [3]. Dans le monde, le marché de la nutrition animale est largement tiré par une demande croissante d'aliments pour les volailles, qui représente environ 47% de la consommation totale (Kulshreshtha et al., 2020). Plusieurs entreprises d'algues, telles qu'Aurora (Edmonds, WA), Alltech (Nicholasville, KY), Cellana (Kailua-Kona, HI), Ocean Harvest (Comté de Galway, Irlande), Olmix (Bréhan, France), MBD

(Melbourne, Australie), AquAgri (New Delhi, Inde) et ASL (NS, Canada), produisent et commercialisent des aliments de haute qualité à base d'algues pour l'alimentation animale. Ces produits commerciaux peuvent potentiellement améliorer la santé et les performances des animaux d'élevage à des faibles coûts (Kulshreshtha et al., 2020).

De plus, l'utilisation croissante des macroalgues dans les aliments, les engrais agricoles, les additifs alimentaires pour animaux, les produits pharmaceutiques, cosmétiques et de soins personnels devrait stimuler considérablement la demande du marché. La demande croissante d'hydrocolloïdes dérivés d'algues (tels que les agars, les alginates et les carraghénanes) contribue également de manière significative aux volumes et aux valeurs totales du marché commercial des macroalgues. En effet, l'agriculture et les applications d'alimentation animale détenaient la deuxième plus grande part de marché des macroalgues en 2017 (Kulshreshtha et al., 2020), et ceux-ci devraient atteindre des valeurs beaucoup plus élevées d'ici 2024, en raison des impacts de la recherche et de développement actuelle ciblant l'amélioration de la santé et de la productivité animales (Kulshreshtha et al., 2020).

En agriculture, essentiellement les macroalgues brunes et vertes sont utilisées telle qu'un engrais naturel afin de stimuler la croissance des plantes, améliorer la résistance au stress. Ces engrais améliorent la porosité des sols et donc une meilleure rétention d'eau (Ammar et al., 2022)

En outre, les macroalgues possèdent une capacité à éliminer efficacement l'azote de l'eau de mer, réduisant ainsi les effets d'eutrophisation et améliorant la qualité de l'eau (Kotta et al., 2022). Certaines sont capables d'absorber les métaux lourds tels que le zinc et le cadmium de l'eau polluée. Les effluents, et les eaux des fermes piscicoles contiennent généralement des niveaux élevés de déchets qui peuvent causer des problèmes pour les autres vies aquatiques dans les écosystèmes aquatiques adjacentes. Les macroalgues peuvent souvent utiliser une grande partie de ces déchets comme nutriments. Des essais ont donc été entrepris pour cultiver des algues dans les zones adjacentes aux fermes piscicoles (Milhazes-Cunha et al., 2017). En Inde, le plus grand producteur d'urée, la Krishak Bharti Cooperative Limited, a lancé un produit innovant et durable SIVARIKA en tant que biostimulant à base d'algues en janvier 2023. Les granules de SIVARIKA sont enrichis d'extrait d'algues rouges et brunes. Ce biostimulant vise à stimuler la production de cultures de macroalgues et à faciliter la santé des sols [4].

Une autre utilisation potentielle des macroalgues est la production de biocarburant. Cela peut être accompli, par exemple, en utilisant la biomasse d'algues comme substrat pour la production de biocarburant qui remplace les combustibles fossiles (Mahmood et al., 2022). Les biocarburants « bleus » dérivés des algues ne sont pas en concurrence avec l'agriculture car ils

ne nécessitent pas de terres arables, d'eau douce ou d'engrais chimiques (herbicides ou pesticides), et sont donc potentiellement plus respectueux de l'environnement que les biocarburants actuels dérivés des cultures de plantes terrestres.

Les pigments issus des algues continuent également à susciter de l'intérêt dans les procédés de valorisation de la biomasse algale. Ils confèrent d'ailleurs aux algues des critères phénotypiques impliqués dans la classification de ces organismes marins. En se référant à la pigmentation des algues, trois phylums ont été définis à savoir : *Chlorophyta* ou algues vertes, *Rhodophyta* ou algues rouges et *Ochrophyta* ou algues brunes. Les principaux pigments produits par les algues sont (i) les caroténoïdes, comprenant à la fois des carotènes et des xanthophylles, (ii) les chlorophylles et (iii) les phycobilines (Pereira et al., 2021). Les algues brunes présentent par exemple une composition riche et diversifiée en pigments dont les chlorophylles *a* et *c* ; les carotènes en particulier l' α -carotène et le β -carotène ; ainsi que les xanthophylles (Yuan et al., 2018). Les néoxanthines A et B, la fucoxanthine et la violaxanthine représentent les xanthophylles dominantes chez les algues brunes (Park et al., 2021). Les pigments d'algues brunes ont été utilisés par l'industrie agroalimentaire comme colorants pour améliorer l'apparence des aliments destinés à l'alimentation humaine et animale. Par ailleurs, certains pigments possèdent des activités significatives dans divers secteurs de la santé. Ces pigments, dont la fucoxanthine, la zéaxanthine et l'astaxanthine, se sont ainsi montrés capable de rétablir des troubles chroniques humains, tels que le diabète, l'obésité, le cancer, les maladies cardiovasculaires, inflammatoires, neurodégénératives et immunitaires (Aryee et al., 2018). La fucoxanthine de *S. japonica* peut réguler la mélanogenèse, conférant ainsi une protection contre l'irradiation aux UVB (Lourenço-Lopes et al., 2021).

Les macroalgues brunes sont par ailleurs constituées d'une paroi cellulaire complexe et dynamique riche en PS, tels que les alginates, les fucoïdanes, les laminarines et la cellulose. Comme exemplifié plus haut, ces PS d'algues ont montré de nombreuses bioactivités, *i.e.* antioxydante, anticancéreuse, anti-inflammatoire ou encore anticoagulante. Couplés à leur faible toxicité et à leur biocompatibilité, ces PS sont des biopolymères naturels attractifs pour des applications médicales :

- Les alginates, sous forme de sels de sodium ou de calcium sont des PS composés de deux unités monomériques qui sont l'acide β -D-mannuronique (M) et l'acide α -L-gulonique (G). Ils présentent des activités prébiotique, immunomodulatoire, antioxydante, antihypertensive, anti-diabétique, antitumorale, anticoagulante, et anti-hypertensive (Liu et al., 2019).

-
- Les fucoïdanes dérivés aussi d'algues ont des propriétés antibactériennes et antioxydantes et sont utilisés dans de nombreux compléments nutritionnels. Les hétéropolysaccharides connus comme PSS contenant principalement du fucose et d'autres sucres tels que le glucose, le galactose, la xylose, le mannose et l'acide uronique, ils sont réputés pour leurs effets anticoagulants, antithrombotiques, antiviraux, anti-inflammatoires et anticancéreux... (Wang et al., 2019).
 - Les laminarines sont quant à eux des PS de réserve, de structure β -(1,3)-glucane, ayant des activités prébiotique, antioxydante, anticoagulante, hypocholestérolémiante et antimutagène, et immunomodulatrice (Jönsson et al., 2020).

Aujourd'hui, la valorisation des biomolécules issus d'algues est une stratégie prometteuse pour intégrer les ressources naturelles sous-exploitées bien que les macroalgues fassent l'objet d'un intérêt croissant pour leur potentiel utilisation dans l'alimentation humaine et/ou animale, cosmétique, en tant que composants bioactifs, et même pour la genèse de vecteurs énergétiques (biocarburant). Le développement de processus de bioraffinerie de ces macroalgues, plus performants et éco-réfléchis, reste toujours d'actualité.

Malgré plus de 1 300 km de côtes, la Tunisie ne dispose d'aucune filière de culture et/ou d'exploitation des macroalgues marines à des fins commerciales. Ouverte sur les deux bassins de la Méditerranée, le bassin occidental par sa façade nord, et le bassin oriental par ses façades est et sud-est, la Tunisie possède une topographie très variée de son littoral : côtes rocheuses, sableuses et de nombreuses îles. Le climat tunisien, de type méditerranéen ayant un été chaud et sec et un hiver doux et pluvieux, avec des températures de l'eau variant de 14°C en hiver à plus de 29°C en été, favorise la croissance de certains macroalgues. La salinité des eaux de surface reste plus faible au nord (moins de 36 PSU) que dans le sud (39 PSU, i.e. dans le Golfe de Gabès) en raison de l'influence des eaux atlantiques dans le bassin occidental. Une variation importante de la salinité de surface est toutefois observée sur les côtes, en raison de la forte évaporation estivale (Kmiha-Megdiche et al., 2020 ; Ktari et al., 2021). L'ensemble de ces spécificités confèrent ainsi à la Tunisie une biodiversité marine particulièrement intéressante.

L'exploitation ou la culture des macroalgues marines du littoral tunisien pourrait constituer une ressource et une manne financière qui reste toutefois conditionner par la faible quantité de travaux de recherche et de preuves de concept, capables de soutenir leurs intérêts biologique et économique. Dans ce contexte, l'Unité de Biotechnologie des algues (UBA) à l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax (ENIS) - Université de Sfax s'intéresse depuis 2013 à la valorisation des macro- et microalgues. Ce travail de thèse est réalisé en cotutelle entre l'équipe 4Bio de l'axe Génie des Procédés, Energétique et Biosystèmes de l'Institut Pascal

(UMR CNRS– 6602) - Université Clermont Auvergne (France) et l'UBA de l'ENIS - Université de Sfax. Il a pour objectif l'extraction et la caractérisation structurale, technofonctionnelle et biologique de la biomasse et de biomolécules à savoir des PS matriciels issus d'une algue brune du littoral tunisien, *H. scoparia*, collectée au niveau des côtes de la ville de Tabarka (36° 57' 36.223" N and 8° 45' 12.018" E) (**Figure 1**).

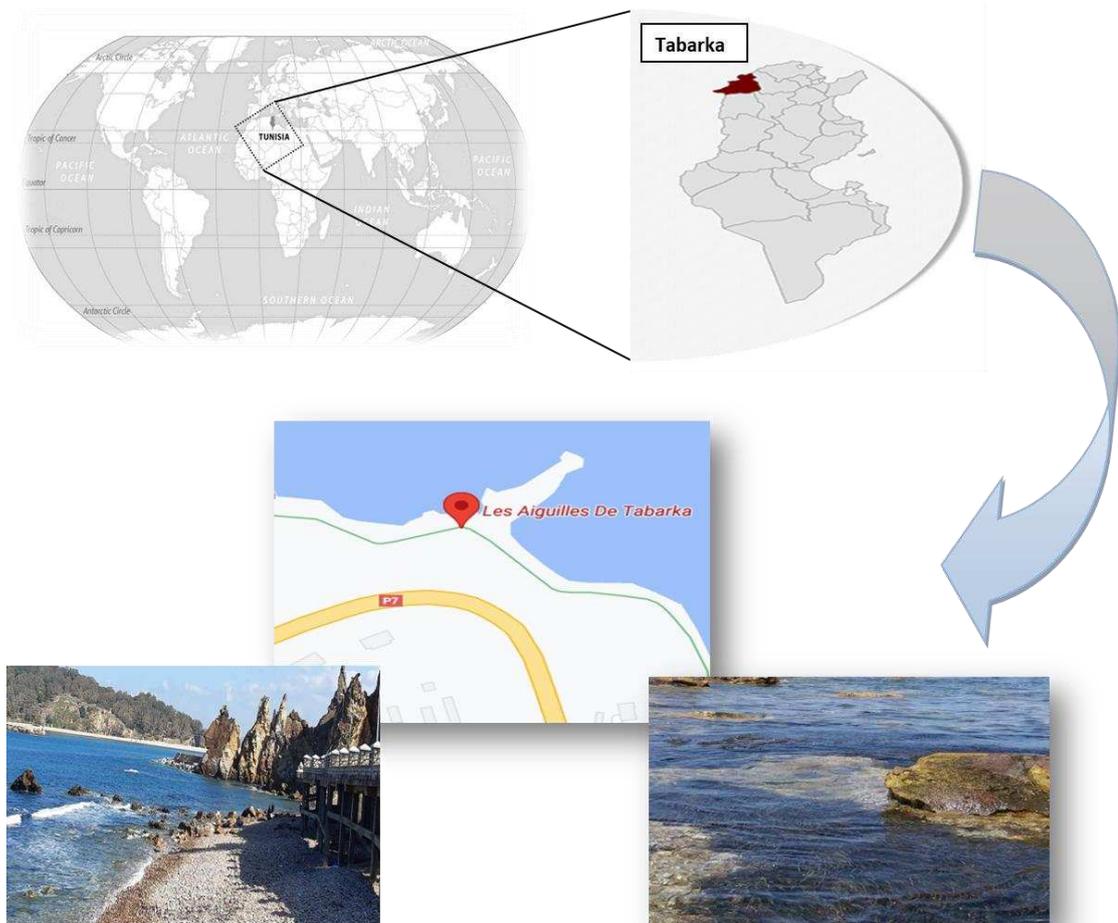


Figure 1. Site d'échantillonnage (Tabarka).

Le choix de cette macroalgue a été motivé par son abondance sur le littoral tunisien, l'absence de littérature sur son contenu en PS et son intérêt en tant qu'espèce productrice d'hydrocolloïdes et de pigments par analogie avec d'autres espèces apparentées de Phéophycées (**Figure 2**).

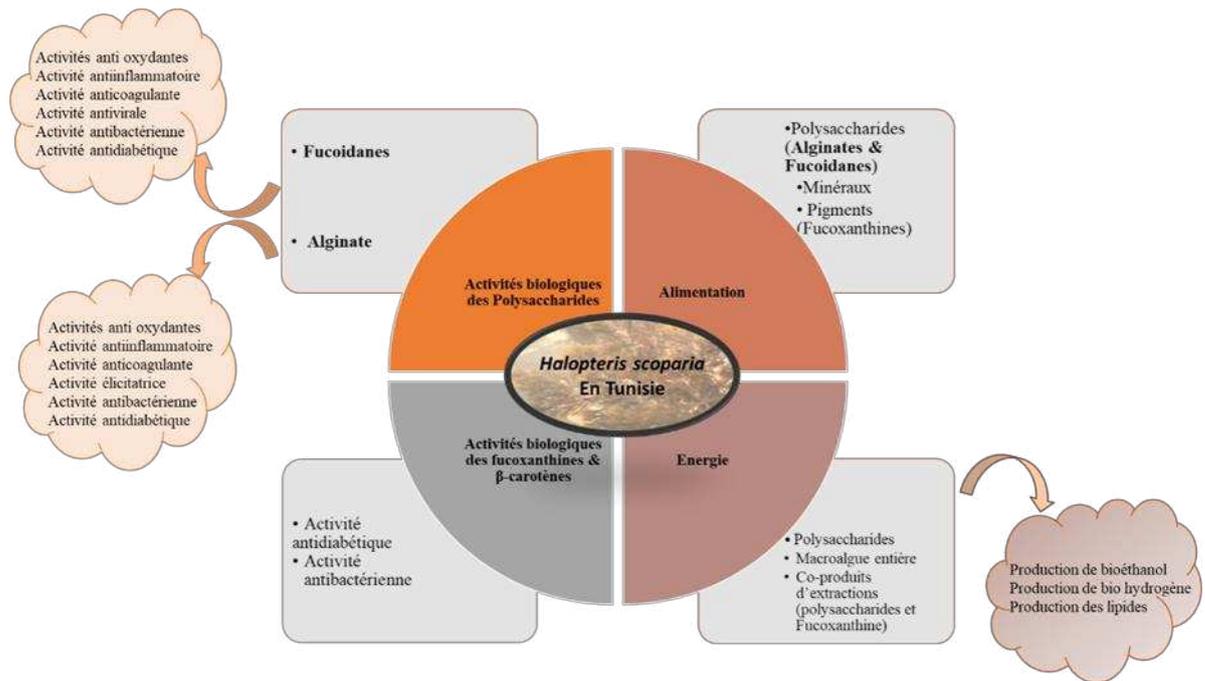


Figure 2. Valorisation du potentiel de la macroalgue brune *H. scoparia*.

Le travail de cette thèse s'articule en 3 grandes parties :

- Dans un premier temps, une synthèse bibliographique organisée en 3 sous parties : (i) la première porte sur des généralités concernant les macroalgues, leur taxonomie ainsi que leurs potentiels industriels ; (ii) la deuxième consiste en la description des différentes classes des PSS algaux (en particulier ceux identifiés au sein des macroalgues brunes) ainsi que la présentation de leurs propriétés biologiques et physico-chimiques ; (iii) la troisième traite les différents pigments caractéristiques des macroalgues, essentiellement la fucoxanthine et le β -carotène caractéristiques des macroalgues brunes et de leurs potentialités biologiques ;
- Une seconde partie de cette thèse est réservée à la présentation du matériel utilisé et à la description des méthodes, techniques et méthodologies adoptées au cours de cette thèse ;
- Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans une troisième partie, segmentée en 3 sous chapitres : (i) le premier consiste en l'identification moléculaire de la macroalgue collectée et le développement de procédés d'extraction et de purification de ses polysaccharides constitutifs, à savoir (a) les fucoïdanes (FHS) et (b) les alginates (AHS). Leur caractérisation structurale complète, la détermination de leurs propriétés rhéologiques ainsi que l'étude de leurs potentiels biologiques (activités antivirale, antibactérienne, antidiabétique, anti-inflammatoire, anticoagulante, élicitrice) sont également abordées ; (ii) le deuxième concerne l'extraction des pigments de la famille des caroténoïdes à savoir (a) la fucoxanthine (P-FX) et le β -carotène (P-CT) (b) et l'étude de leurs potentiels

antidiabétiques et antibactérien ; (iii) le troisième s'intéresse à la valorisation de la macroalgue brune *H. scoparia* et ses sous-produits générés après l'extraction des polysaccharides et des pigments pour la production de bioénergie à savoir (a) le bio-éthanol, (b) le bio-hydrogène et (c) le bio-diesel. L'objectif de ce chapitre est de fournir une preuve de concept de la valorisation de la macroalgue et/ou de sous-produits générés après l'extraction des biomolécules à haute valeur ajoutée, vers la filière énergie en Tunisie, dans un esprit d'économie circulaire.



ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I



I. Les macroalgues

I.1. Généralités

Les algues sont des organismes marins eucaryotes qui peuvent vivre et se reproduire dans des écosystèmes aquatiques. Elles sont largement distribuées partout dans le monde et occupent une grande variété d'habitats. Les algues constituent un groupe très diversifié, avec des spécimens de toutes formes et tailles, allant d'organismes unicellulaires microscopiques (microalgues) à des organismes macroscopiques (macroalgues), pouvant atteindre plusieurs mètres de longueur. Les macroalgues, ayant des tailles très importantes et des morphologies plus complexes, se développent plus rapidement et sont moins vulnérables au broutage et à la turbulence de l'eau que les microalgues. Elles sont classées, comme décrit en introduction, en algues vertes, rouges et brunes selon la couleur de leurs thalles dérivée des pigments qu'elles contiennent. Les algues vertes appartiennent au phylum *Chlorophyta* et il existe environ 4 500 espèces d'algues vertes (Bold et al., 1978). Les algues rouges sont incluses dans une seule classe, les Rhodophycées, il existe environ 4 000 à 6 000 espèces d'algues rouges, pour plus de 600 genres (Lobban et al., 1981). Enfin, les algues brunes représentent les Phéophycées, et environ 1 500 à 2 000 espèces d'algues brunes ont été identifiées (Hoek et al., 1995). Les macroalgues marines sont réparties verticalement de la zone supérieure (surface de la mer) à la zone sublittorale inférieure (Bischof et al., 1998). En fait, bien que de nombreuses espèces prospèrent dans les zones littorales, certaines algues rouges habitent les zones marines plus profondes (plus de 25 m sous la surface) tandis que d'autres se trouvent sous les rochers, où la disponibilité de la lumière directe du soleil est limitée (Santelices et al., 1991) (**Figure 3**). Les algues rouges utilisent une partie différente du spectre lumineux utilisé par les autres algues et sont donc capables de se développer dans des écosystèmes différents. En outre, les macroalgues sont des organismes cosmopolites, se répartissant dans différents milieux, à savoir, les zones littorales et les milieux marins incluant les eaux douces, les eaux de mer, les marais salants, les eaux saumâtres. Leur répartition dépend non seulement de la disponibilité de la lumière mais aussi de la nature de l'écosystème et de la composition des eaux. Elles peuvent être benthiques (i.e. fixées sur un support) comme *Cystoseira stricta*, *Padina pavonica*, *Caulerpa racemose*, *Corallina elongata*, soit pélagiques (i.e. flotter librement dans l'eau) comme c'est le cas des espèces de sargasse telle que *Sargassum fluitans* (Mangialajo et al., 2008 ; Godínez-Ortega et al., 2021). Certaines sont thermophiles tandis que d'autres sont adaptées à des environnements hypersalins (Xu et al., 2013). Elles peuvent collaborer avec d'autres organismes et donner

naissance à des symbioses, par exemple avec des lichens où elles forment avec les champignons le groupe des thallobiontes (Aschenbrenner et al., 2016). Enfin, ce sont des organismes photosynthétiques capables de produire de la matière organique (e.g. des PS) en convertissant la matière inorganique et minérale en présence d'eau, de lumière et de dioxyde de carbone *via* leurs pigments photosynthétiques, situés au niveau des chloroplastes, capables de capter les photons de diverses longueurs d'ondes selon leurs appareils pigmentaires (Ballesteros et al., 2022).

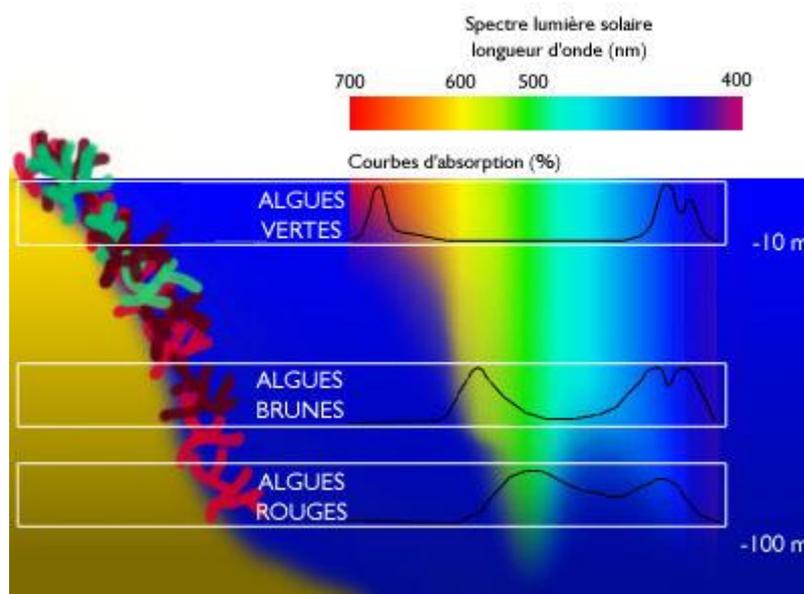


Figure 3. Systèmes pigmentaires des macroalgues en fonction de leur profondeur et longueurs d'ondes d'absorption de leurs pigments [5].

Plus précisément, les macroalgues sont des organismes eucaryotes multicellulaires, dépourvus de système racinaire, de feuilles et de tiges. Elles se fixent par leurs crampons (ou leurs disques basales) sur les coraux blanchis, les cailloux, les galets et les substrats rocheux (Pereira et al., 2021). D'autres macroalgues poussent sous forme d'épiphytes, composées de nombreuses cellules bien organisées qui forment des thalles de taille et de forme très variables (Pereira et al., 2021). Les macroalgues sont dépourvues de vaisseaux conducteurs, à l'exception de quelques macroalgues brunes, comme des laminaires et des fucus qui possèdent des ébauches rudimentaires (Croft et al., 2006). Plus de 20 000 espèces ont été identifiées dont certaines ont été exploitées par l'Homme (Corlett et al., 2016). Notons que l'accumulation de macroalgues mortes sur les rivages suite à de forts courants ou à des mouvements brusques dans les écosystèmes aquatiques sont à l'origine de phénomène d'upwelling (Kazmi et al., 2022).

I.2. Modes de reproduction

Les macroalgues se multiplient selon deux modes de reproduction à savoir sexuée, moyennant des gamètes, et la multiplication végétative qui représente le mode le plus fréquent. Cette reproduction asexuée se réalise par des mitoses équationnelles consécutives ce qui implique la restauration d'un seul génotype, qui est conservé et identique chez les descendants (**Figure 4**). Elle se manifeste soit par bipartition végétative ou par simple fragmentation du thalle aboutissant à la formation de plusieurs organismes identiques à partir d'un seul fragment. Les macroalgues peuvent produire des spores, qui sont des cellules spécialisées formées à l'intérieur des sporocystes. Selon les espèces, les spores libérées peuvent être immobiles (aplanospores) ou mobiles (zoospores). Ces spores sont capables de se fixer sur un substrat et de germer. Outre leur capacité de reproduction asexuée, les macroalgues eucaryotes ont la capacité de se reproduire par voie sexuée, qui est assurée par des gamétophytes. Ce processus est permis grâce à l'union des deux gamètes conduisant à la formation d'un zygote diploïde. Les macroalgues alternent, souvent, entre ces deux modes de reproduction (Endo et al., 2021) (**Figure 4**).

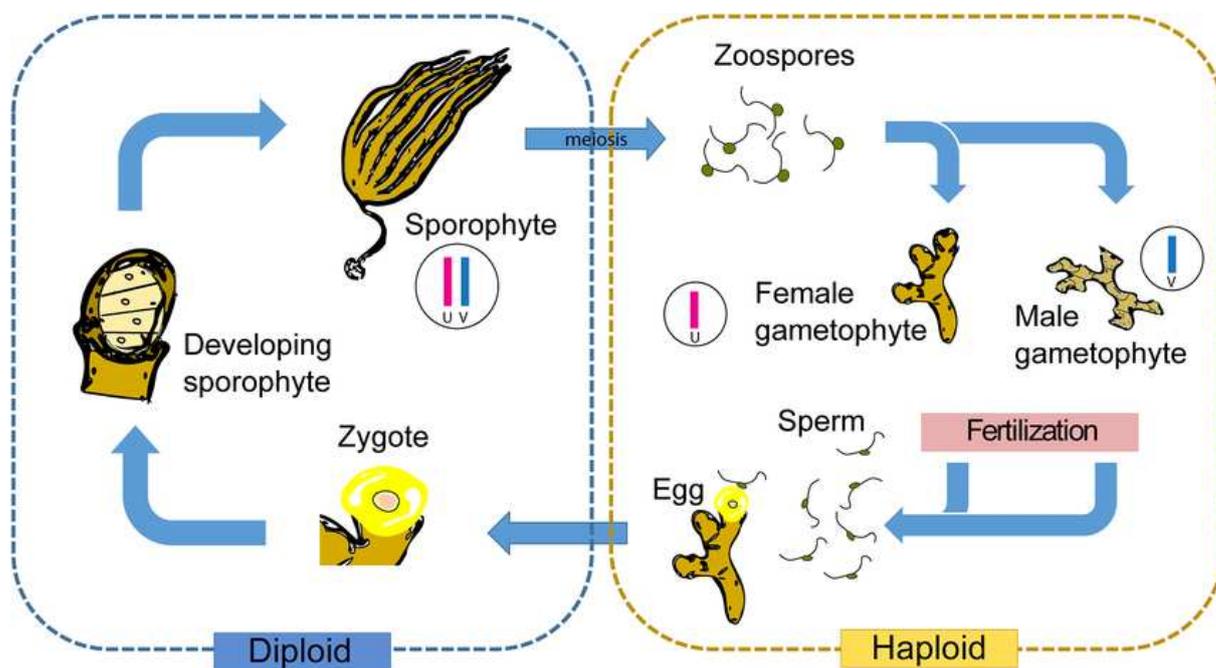


Figure 4. Reproduction chez les macroalgues (Lipinska et al., 2015).

I.3. Classification des macroalgues

Les macroalgues ont été traditionnellement classées selon des caractéristiques morphologiques, physiologiques et/ou biochimiques. La complexité de l'appareil végétatif et

la forme des thalles ainsi que la nature du support sur lequel se fixe les macroalgues permettent de différencier les différents groupes (Pereira et al., 2021).

La nature des pigments des macroalgues ainsi que leurs compositions en PS est à l'origine de l'apparition de 5 groupes d'organismes photosynthétiques, à savoir les cyanophytes et les Prochlorophytes qui constituent le groupe des procaryotes et le groupe des eucaryotes qui incluent les Chlorophytes, les Rhodophytes et les Chromophytes (Mourelle et al., 2017) (**Figure 5**).

La théorie de l'endosymbiose primaire entre une cyanobactérie et une cellule eucaryote non photosynthétique hétérotrophe explique l'apparition des algues rouges et vertes. Quant aux algues brunes, leur apparition a été expliquée par une endosymbiose secondaire entre une cellule eucaryote primitive et une algue rouge ou entre une cellule eucaryote primitive et une algue verte. Dès lors, trois grandes classes de macroalgues eucaryotes ont été identifiées à savoir les Chlorophytes, Rhodophytes et Phéophytes, qui constituent respectivement les groupes des algues vertes, rouges et brunes (Rockwell et al., 2014 ; Pereira et al., 2021) (**Figure 5**).

Néanmoins, les systématiques et taxonomies associées au phytoplancton sont en perpétuelle évolution, du fait des avancées des recherches en biologie moléculaire et, également, en morphométrie.

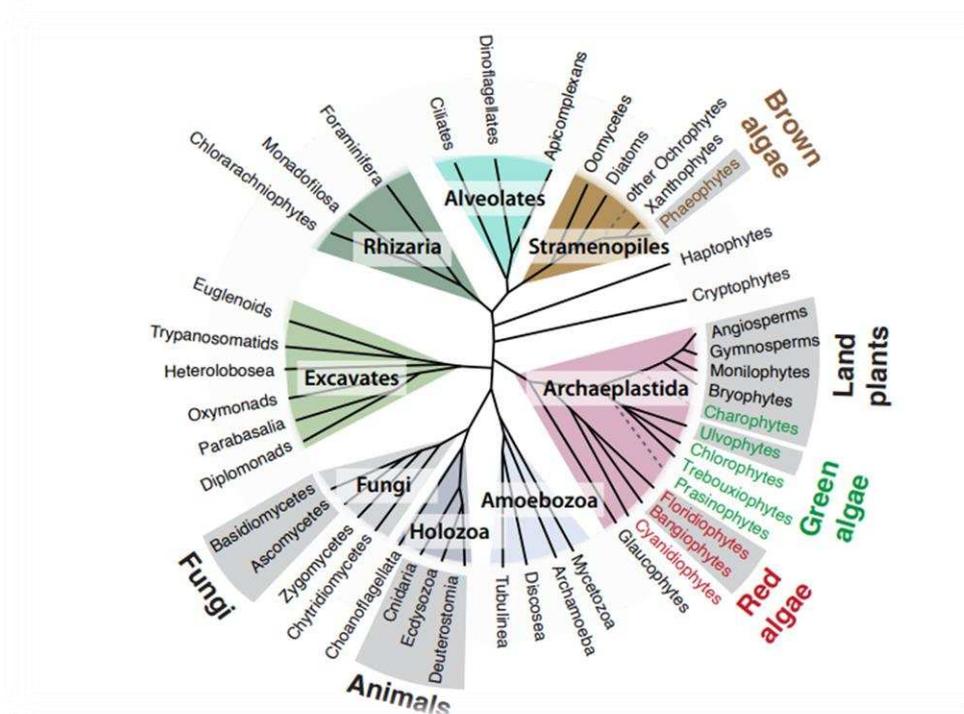


Figure 5. Arbre schématisé des eucaryotes montrant les positions phylogénétiques des algues brunes, rouges et vertes (Kloareg et al., 2021).

I.3.1. Les Chlorophycées

Les Chlorophycées regroupent plus de 4 500 espèces. Elles peuvent avoir des formes variables incluant différents systèmes pigmentaires, à savoir les caroténoïdes et les xanthophylles, associés à des pigments majoritaires responsables de la coloration verte de ces organismes, qui sont les chlorophylles *a* et *b* (Naik et al., 2020).

Ces organismes colonisent les milieux dulcicoles et marins et jouent un rôle important dans l'oxygénation des environnements aquatiques. Notons que certaines macroalgues vertes ont la capacité de croître en milieu terrestre telle que *Prasiola calophylla* alors que la majorité vivent en eau douce et milieu marin telle que *Ulva rigida* (Häder et al., 2018).

I.3.2. Les Rhodophycées

C'est une classe très diversifiée d'organismes marins, pluricellulaires qui colonisent les eaux relativement chaudes. En plus, des chlorophylles *a* et *b* et des caroténoïdes, ces macroalgues produisent des phycoérythrines qui sont à l'origine de la couleur rougeâtre de ces algues. Selon la complexité de leur voie de reproduction, les Rhodophycées peuvent être classées en Bangiophycées qui représentent les formes primitives de ces organismes et les Floridéophycées qui correspondent aux formes les plus complexes (Garon-Lardièrre et al., 2004).

I.3.3. Les Phéophycées

Cette classe correspond aux algues brunes regroupant environ 1 800 espèces majoritairement marines et pluricellulaires. Outre les chlorophylles *a* et *c* et le β -carotène, ces macroalgues sont caractérisées par la présence de xanthophylles responsables de la coloration brunâtre de leurs thalles (Garon-Lardièrre, 2004).

I.3.3.1. Ordre Sphacélariales, familles et classes

D'un point de vue morphologique, les Sphacélariales ont une structure très caractéristique avec la présence d'axes dressés polysiphonnés et des ramifications hémiblastées (Katsaros et al., 1986). L'ordre des Sphacélariales est subdivisé en quatre familles : les Cladostephaceae (monotypiques), les Sphacelariaceae, les Stypocaulaceae et une nouvelle famille monotypique les Sphacelodermaceae. Les Stypocaulaceae incluent notamment les espèces *H. scoparia* et *H. filicina*. Ces deux macroalgues partagent plusieurs caractéristiques morphologiques, à savoir une masse rhizoïdale, une ramification pennée, la présence de sphacèles à l'extrémité de la

plupart des rameaux et la couleur. Les rhizoïdes d'*H. scoparia* sont caractérisés par la présence de filaments, c'est à-dire de thalles dressés, buissonnants, à texture délicate, de couleur rougeâtre à brunâtre, leur hauteur étant d'environ 7 cm. Ces deux espèces présentent des ramifications alternées et pennées et des sphacèles à l'extrémité de leurs rameaux. Dans la partie basale de leurs thalles le nombre des cellules médullaires est indéterminé et leur morphologie est angulée. Ces cellules sont dépigmentées, de longueur variant de 19 à 27 μm , et de diamètre allant de 6 à 20 μm . Le médium et la partie supérieure du thalle sont formés de quatre parois épaisses de cellules médullaires de 37 μm de long et de diamètre 25 μm , encerclées par de petites cellules corticales. Les cellules corticales sont densément pigmentées, de longueur variant de 9 à 26 μm et de diamètre de 2 à 13 μm .

La structure reproductrice (probablement un sporange) est uniloculaire ellipsoïdale, axillaire, solitaire ayant une longueur de 100 μm et un diamètre de 80 μm avec une paroi épaisse et sessile. Les Stypocaulaceae ont des structures de fixation formées par une masse rhizoïdale. Plus tôt, *H. scoparia* a été affiliée au genre *Stypocaulon* Kützing, actuellement considéré comme un synonyme d'*Halopteris* (García-Ferrer et al., 2019).

I.3.3.2. Espèce d'intérêt: *H. scoparia*



Figure 6. Morphologie de *H. scoparia*.

I.3.3.3. Classification

Règne : Chromista
Embranchement : Ochrophyta
Classe : Phaeophyceae
Ordre : Phacelariales
Famille : Stypocaulaceae
Genre : *Halopteris*
Espèce : *Halopteris scoparia*

H. scoparia, connue sous le nom de « balai de mer », est une espèce de macroalgue présente dans la mer Méditerranéenne, la mer Noire, le Nord-Est et le Nord-ouest de l'Atlantique à une profondeur ne dépassant pas les 30 m. Elle existe sous forme de touffes denses et compactes, de 5 à 15 cm de hauteur. Elle se fixe sur des fonds rocheux ou sableux par un ensemble de filaments microscopiques ayant des structures parenchymateuses (rhizoïdes).

I.4. Composition des macroalgues

Les biomasses des macroalgues peuvent produire un large éventail de nutriments et de métabolites secondaires bioactifs. La composition des macroalgues varie considérablement en fonction des espèces et des conditions environnementales (l'intensité lumineuse, l'habitat, la salinité, la température, ...) (**Figure 7**).

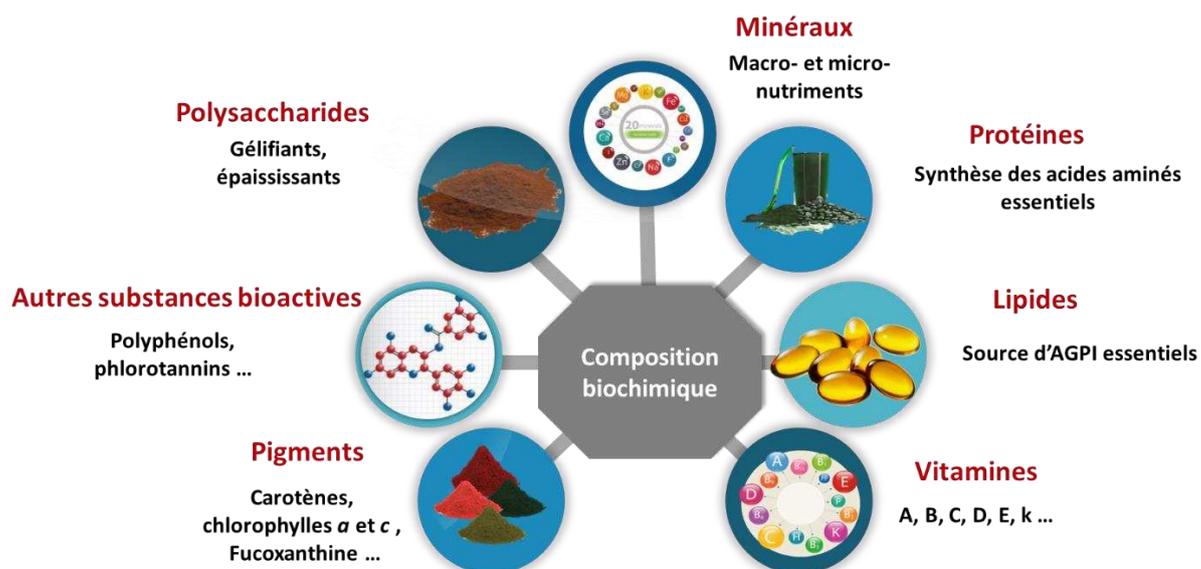


Figure 7. Hétérogénéité des métabolites synthétisés par les macroalgues.

Les macroalgues marines contiennent de grandes quantités en PS, souvent de hautes masses molaires, comme les agars et les agaroides, les alginates, les fucoïdanes ou les ulvanes, allant parfois jusqu'à 70% (en matière sèche) (Lee et al., 2022). Ces PS peuvent jouer des rôles de structure au sein des macroalgues ou représenter des réserves (Tanna et al., 2019). Ces glucides (hydrocolloïdes) peuvent servir de texturants grâce à leur capacité à changer la viscosité de solutions (Muthukuma et al., 2021).

Les macroalgues sont caractérisées par des teneurs en minéraux de l'ordre de 40% de la matière sèche (Circuncisão, et al., 2018). Les teneurs en oligo-éléments élevées chez certaines espèces sont expliquées par la capacité des parois algales à la captation de différents types de sels et de minéraux dans leurs environnements. Les algues vertes contiennent ainsi entre 6 et 30% d'éléments minéraux, teneurs étant plus importantes chez les algues brunes (12-36%) et les algues rouges (15-30%). Notons que les Phéophycées et les Rhodophycées se caractérisent par une composition en éléments minéraux presque semblable (Premarathna et al., 2022).

Les macroalgues sont composées par divers éléments chimiques inorganiques ayant des fonctions spécifiques. Parmi ces éléments sont cités les P, N, K, Ca, S, Mn, Mo, Na :

- Le phosphore qui intervient dans la structure des macroalgues et le transfert énergétique ;
- L'azote qui possède une importance métabolique ;
- Le potassium entre dans la régulation osmotique et la stabilité des protéines ;
- Le calcium est un activateur d'enzyme et cofacteur dans le transport ionique ;
- Le soufre participe directement avec les groupements du site actifs des enzymes et des co-enzymes ;
- Le manganèse et le cuivre entrent dans le processus de la photosynthèse et permettent le transfert d'électron ;
- Le molybdène entre dans l'absorption ionique ;
- Le sodium possède un rôle osmotique et active les enzymes.

En plus des éléments minéraux, les macroalgues sont riches en vitamines (A, B, B₂, B₃, B₆, B₁₂, C, D, E, K). A titre d'exemple, les macroalgues vertes et brunes se caractérisent par leurs richesses en vitamine C, de l'ordre de 500 à 3000 mg/kg (MS). Les algues brunes sont particulièrement riches en vitamine E avec des valeurs variant entre 200 et 600 mg/kg (MS) (Bouali et al., 2021 ; El-Beltagi et al., 2022). Les protéines représentent également un constituant majeur des macroalgues. Elles sont présentes majoritairement sous forme de protéines pigmentaires, à savoir les phycobilliprotéines (Cikoš et al., 2022) (**Figures 8 et 9**).

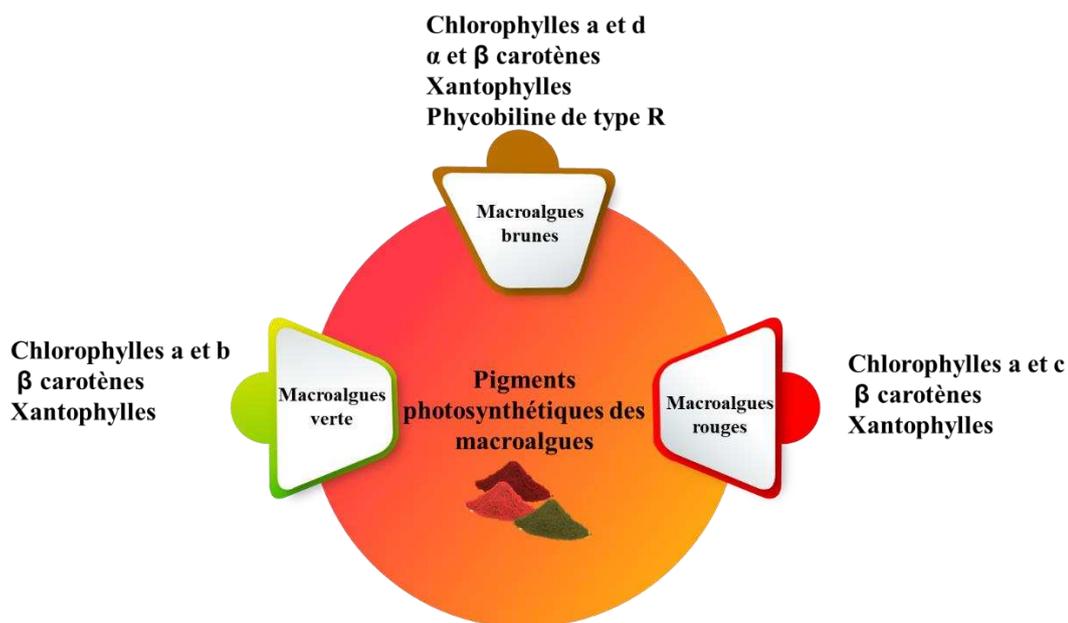


Figure 8. Les différents pigments constituant les appareils photosynthétiques des macroalgues vertes, brunes et rouges.

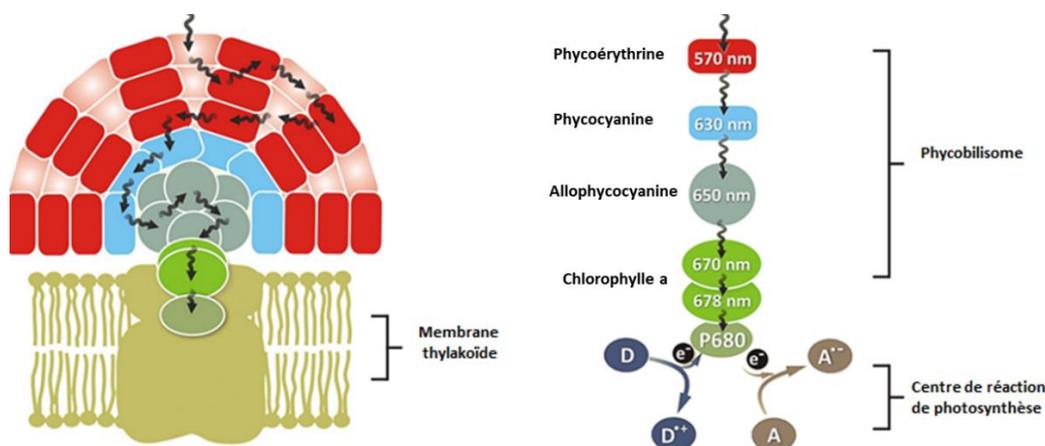


Figure 9. Organisation des pigments de phycobilisome au niveau de la membrane du thylakoïde des macroalgues rouges [6].

Chez les macroalgues, la teneur en protéines est très variable. A titre d'exemple, les protéines représentent 35% (MS) de *Porphyra tenera* et *Ulva pertusa* (Fleurence et al., 1999). Cette teneur ne dépasse pas les 15% chez les macroalgues brunes, e.g. *Laminaria digitata*, *A. nodosum*, *F. vesiculosus* et *Himantalia elongata* (Fleurence et al., 1999).

Les macroalgues, et particulièrement les macroalgues brunes, sont connues pour leur capacité à produire des lipides riches en acides gras polyinsaturés. Cette production est caractérisée par une variation en quantité et en composition des acides gras, attribuée aux

caractéristiques intrinsèques des espèces (différences génétiques) et aux conditions abiotiques (intensité lumineuse, pH, salinité, température) (Lourenço-Lopes et al., 2020). Outre les acides gras, la fraction lipidique des macroalgues contient également des glycolipides et des phospholipides (Lopes et al., 2021).

Les macroalgues sont également caractérisées par des teneurs variables en polyphénols. Les algues brunes possèdent les teneurs en polyphénols totaux de l'ordre de 5 à 15% (Chakraborty et al., 2013). Les composés phénoliques présents dans les macroalgues sont très diversifiés et regroupent des molécules simples comme les acides cinnamiques ou les flavonoïdes et des structures polymériques plus complexes comme les phlorotanins (constitués d'oligomères de phloroglucinol) (Lomartire et al., 2021). Généralement, ces composés phénoliques sont constitués d'un groupe hydroxyle (-OH) lié directement à un groupement hydrocarbure aromatique. Les acides phénoliques (AP) sont formés d'un seul cycle de phénol et d'au moins un groupe d'acide carboxylique fonctionnel, et ils sont classés en fonction du nombre de carbones de la chaîne liée au cycle phénolique. Ainsi, ces acides phénoliques sont classés en C6-C1 pour l'acide hydroxybenzoïque (AHB ; avec une chaîne carbonée attachée au cycle phénolique), C6-C2 pour les acétophénones et les acides phénylacétiques (deux chaînes carbonées attachées au cycle phénolique) et C6-C3 pour les acides hydroxycinnamiques (AHC) (chaînes carbonées attachées au cycle phénol) (Achkar et al., 2005). Les flavonoïdes sont des composés phénoliques avec un hétérocycle d'oxygène lié à deux cycles aromatiques, qui peuvent alors différer selon le degré de leur hydrogénation. Les bromophénols ont des composés phénoliques bromés caractérisés par la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques et des substituants hydroxyle (Güven et al., 2010). Les terpénoïdes sont caractérisés par une chaîne polyprényl liée à un groupement hydroquinone cyclique. Les acides aminés de type mycosporine sont des métabolites secondaires phénoliques, présentant un cycle cyclohexanone ou cyclohexénine, avec des fragments d'acides aminés dans leur structure chimique (Llewellyn et al., 2010).

I.5. Les macroalgues dans l'Industrie

I.5.1. Ressources, production et transformation

Au niveau mondial, la production des macroalgues a connu une forte augmentation ces deux dernières décennies (**Figure 10**). Selon Fao et al. (2014), cette augmentation a dépassé 176% entre 1995 et 2012, en partie grâce à l'aquaculture, qui a permis la croissance maîtrisée de Rhodophycées et de Phéophycées. Sarker et al. (2021) ont confirmé récemment cette

tendance, passant de 10,6 millions de tonnes en 2000 à 32,4 million de tonnes en 2018 (Sarker et al., 2021). Notons que 95% de la production mondiale des macroalgues est réalisée dans les pays asiatiques (Buschmann et al., 2017). En 2019, la Chine et l'Indonésie étaient les pays leaders en algocultures avec des capacités de production de plus de 10 millions de tonnes d'algue fraîches/ ans/pays. En ce qui concerne le continent européen, la France occupe la deuxième position, après la Norvège, avec une production de 90 kt de macroalgues (Buschmann et al., 2017).

La majeure partie de la biomasse macroalgale produite est destinée à l'alimentation humaine, soit pour une consommation des algues fraîches ou de produits transformés. Les macroalgues trouvent des applications dans divers domaines tels que la santé, l'agriculture, le traitement des eaux usées ou l'alimentation animale (Uma et al., 2022).

Le marché mondial des biotechnologies marines destiné à des applications industrielles a atteint 4,8 milliards USD en 2020 et est estimé à 6,4 milliards USD d'ici 2025 [8].

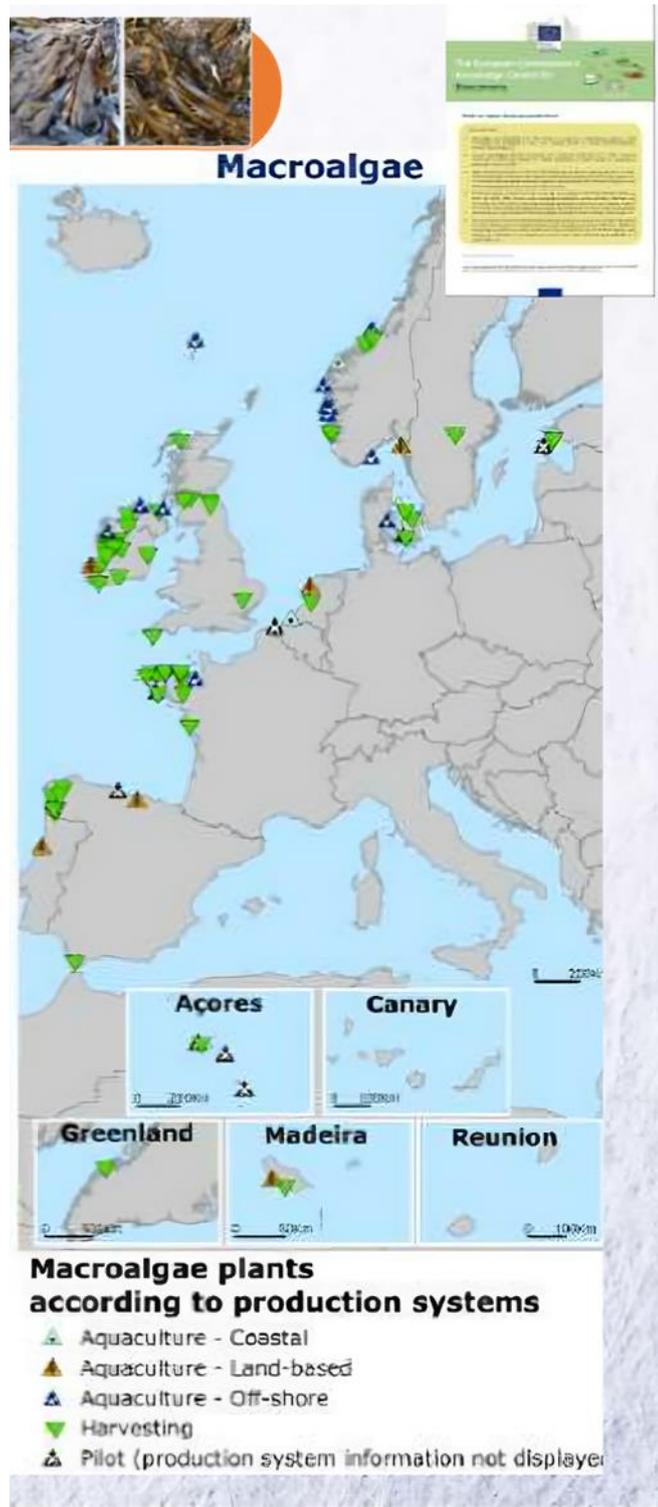


Figure 10. Production et récolte des macroalgues dans le monde [8].

Catégorie d'algues	Algues de fond		Algues d'échouage	Algues de rive		Algues de culture		
Autorité et Gestion	Ministère chargé des mines Préfecture du département		DDTM (1) CRPMEM (2)	DDTM - CRPMEM				
Systèmes de gestion	Titre minier + Autorisation domaniale + Autorisation d'ouverture de travaux		Licence	Autorisation de récolte		Concession		
Producteurs	Sabliers		Goémoniers embarqués	Récoltants à pieds		Algoculteurs		
Espèce d'algues	Maërl - <i>Lithothamnium</i> (arrêté de l'exploitation en 2013) ****		Laminaires <i>L. digitata</i> <i>L. hyperborea</i> ***	Gelidium <i>G. sesquipedale</i> Non communiquée	Petit goémon <i>C. crispus</i> <i>M. stellatus</i> *	Goémon noir <i>Fucus ssp</i> <i>A. nodosum</i> **		
Transformation	Séchage et broyage		Extraction de phycolloïdes		Séchage et broyage	Macération, extraction... Préparation culinaire, conditionnement		
Produits	Filtres, traitements €€	Farines et poudres additives €€€	Alginates €€€€	Agar-agar €€	Carraghénanes €€€€	Farines, poudres additives, engrais liquides €€€	Produits à façon €€€	Produits alimentaires €

LEGENDE : usages des produits

- Agrofournitures et traitement des eaux
- Industrie agroalimentaire, chimie et microbiologie
- Santé, bien-être
- Alimentation « légumes »

Partenaires français



Figure 11. Chaîne de transformation et d'utilisation des macroalgues (Mesnildrey, 2012).

De nos jours, *L. digitata*, *Laminara hyperborea* et *A. nodosum* sont les macroalgues les plus exploitées industriellement par différentes entreprises de transformation (e.g. Cargill) en raison de leurs contenus en macromolécules d'intérêt (hydrocolloïdes). La production des macroalgues pourrait être améliorée par l'installation d'algocultures (Figure 11). Toutefois, ce mode de production est en relation étroite avec le cycle de reproduction de chaque espèce de macroalgue (Buschmaan et al., 2017). Le processus de production des macroalgues s'enchaîne ensuite par une chaîne de traitement et de transformation qui doit s'aligner avec les normes et les réglementations mondiales imposées par la FAO (Figure 12).

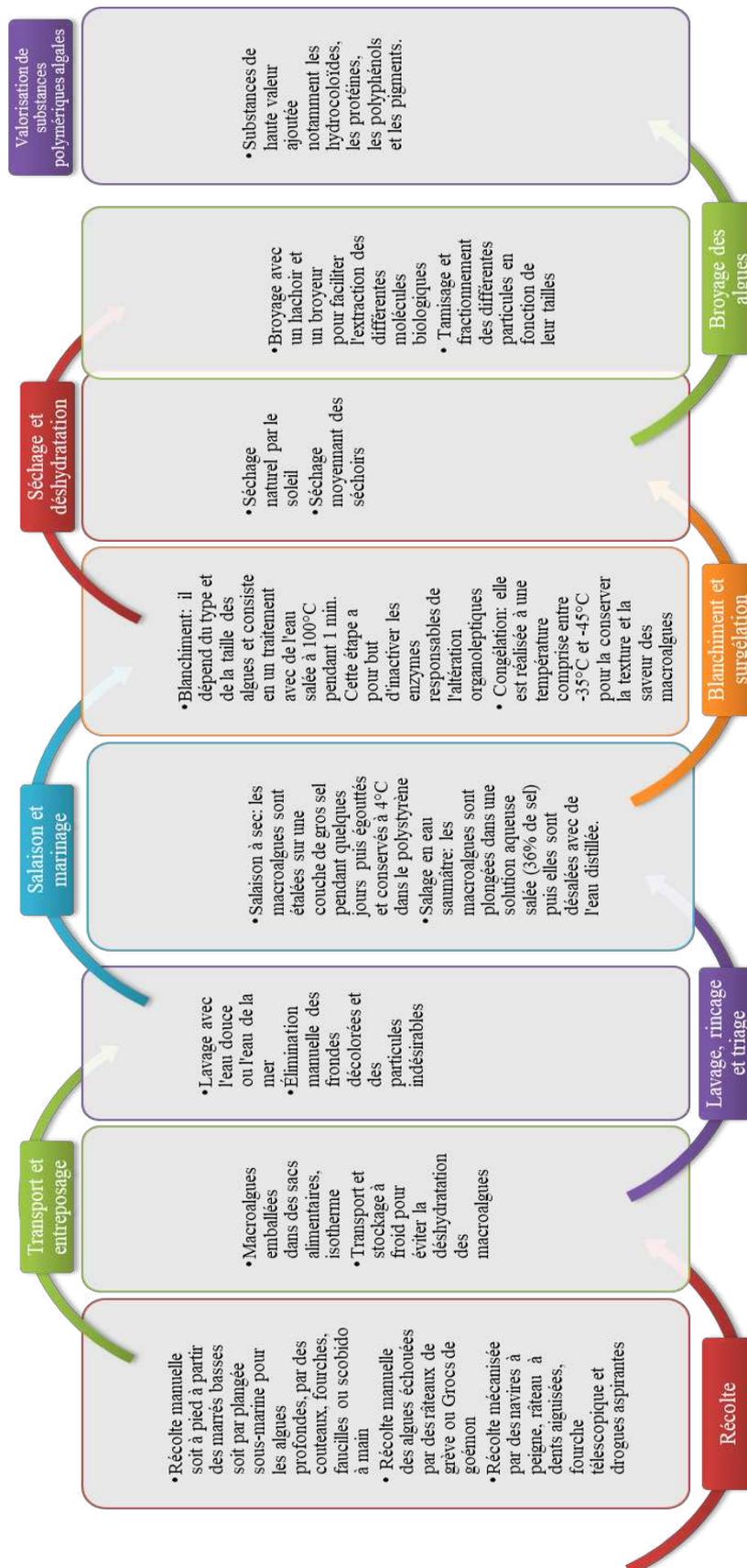


Figure 12. Chaîne de production des macroalgues (source personnelle).

I.5.2. Enjeux écologiques et humains des macroalgues

I.5.2.1. Enjeux écologiques des macroalgues

La contribution des algues en termes de production d'oxygène dépasse 70% de la production mondiale. Cette production est significative en comparaison des productions d'O₂ réalisées par les plantes supérieures (John et al., 1994). Les macroalgues participent également à la préservation des écosystèmes marins par l'absorption de l'excès d'azote dégagé dans le milieu. Elles constituent des habitats écologiques complexes puisqu'elles représentent des lieux de ponte et des zones d'ombrage, participant ainsi à la stabilisation et la protection des côtes des érosions. La lutte contre la prolifération des macroalgues (e.g. les ulvales) fait objet de leurs exploitations industrielles (Stiger-Pouvreau et al., 2020). Ces proliférations sont à l'origine de blooms, entraînant des déséquilibres en azote et phosphate et une chute de la biomasse phytoplanctoniques. L'accumulation des biomasses macroalgales, y compris après échouage, et la difficulté de putréfaction de ces dernières, conduit également à une pollution sanitaire, visuelle et olfactive, pouvant impacter le secteur touristique (Armbrust et al., 2009).

I.5.2.2. Enjeux économiques des macroalgues

En raison de la croissance exponentielle de la population, les besoins en denrées alimentaires, aliments pour animaux, énergie, etc. représentent des défis à relever en 2023. La production des macroalgues est actuellement une industrie de plusieurs milliards USD. A l'échelle mondiale, 291 espèces sont cultivées, comprenant des espèces vertes, brunes et rouges. La production de ceux-ci a montré une croissance annuelle d'environ 10% (Morales-Contreras et al., 2022). Au cours des dix dernières années, les macroalgues brunes et rouges ont été cultivées en quantités beaucoup plus importantes que les macroalgues vertes, la production totale mondiale ayant atteint 30,1 millions de tonnes de matière fraîche en 2016 avec une valeur supérieure à 11,7 milliards USD. En plus, les prévisions suggèrent que les cultures des macroalgues devraient croître de plus de 13% entre 2021 et 2028 (Tan et al., 2020). Cependant, beaucoup de pays n'ont pas un accès direct à la mer pour la culture et la récolte des macroalgues, ce qui représente un défi supplémentaire à l'utilisation et la valorisation de cette biomasse. D'autre part, les changements climatiques liés à l'intense activité humaine a provoqué de graves altérations des écosystèmes marins. Les plus grandes marées vertes et jaunes dues à la prolifération anarchique et excessive de macroalgues continuent à causer des pertes économiques importantes (Xing et al., 2019). De ce fait, la collecte de ces macroalgues et leur valorisation pourrait contribuer à la résolution de ce problème. Certaines entreprises (e.g.

Olmix) en revendiquant l'expertise et la valorise des fractions macroalgales dans les domaines de la santé pour animaux ou du « Feed ». Enfin, les procédés nécessaires à l'obtention de molécules à hautes valeurs ajoutées (PS, protéines, lipides) et/ou « plateformes » (pour la chimie, pour la genèse de vecteurs énergétiques, etc.) peuvent encore être challengés afin d'améliorer leur efficacité tout en réduisant leurs impacts environnements. Il reste donc énormément d'espace pour développer des alternatives industrielles à la valorisation de macroalgues, qui demanderont un changement d'échelle éco-raisonné, du laboratoire au pilote industriel (Tan et al., 2020).

I.5.3. Valorisation et marchés

Les hydrocolloïdes extraits à partir de macroalgues, tels que les agars, les carraghénanes, les alginates ou les laminarines représentent un intérêt industriel particulier, avec une production annuelle mondiale de l'ordre de 100 millions de tonnes, soit environ 1,1 milliard USD (Rhein-Knudsen et al., 2015). D'après les rapports périodiques de la FAO (FAO., 2014), parmi les sept algues les plus cultivées, trois taxons de la classe des Rhodophycées sont principalement utilisés pour la production d'hydrocolloïdes à savoir *Euचेuma* sp., *Kappaphycus alvarezii* pour la production de carraghénanes et *Gracilaria* sp. pour la production d'agars et agaroïdes (**Figure 13**).

Les espèces de macroalgues brunes (Phéophycées), en particulier les ordres des Fucales et des Laminariales, sont les principales sources commerciales des PSS riches en fucose tels que les fucoïdanes (Wahl et al., 2015). Ces derniers peuvent être classés en :

- F-fucoïdanes, qui constituent la forme la plus simple et la plus régulière des fucoïdanes, où le squelette fucoïdane est formé uniquement d'unités α -L-fucose associées avec des groupements sulfates, c'est-à-dire d'homopolymères de L-fucose. Cette forme est abondamment extraite des invertébrés marins (ex. concombre de mer) (Dore et al., 2013 ; Cunha et al., 2016)
- Les galactofucanes/fucogalactanes (G-fucoïdanes ou G-fucanes), très communs chez les algues brunes. Ils sont composés de β -D-galactose en plus de unités α -L-fucose dans des proportions variables. Plusieurs espèces de laminariales et de fucales sont plus riches en G-fucoïdanes (Medeiros et al., 2008 ; Ale et al., 2011) ;
- Les fucomannoglucuronanes (U-fucoïdanes), sont très hétérogènes avec une contribution de plusieurs autres monosaccharides tels que le galactose, le mannose, le rhamnose, le xylose ou encore des acides uroniques (Zayed et al., 2022).

L'état actuel de la production d'algues brunes est en constante augmentation (García-Poza et al., 2020), en particulier pour les espèces *Saccharina sp.* ou *Laminaria sp.* et *U. pinnatifida* qui sont des producteurs majeurs de G-fucoïdane. Par exemple, la production annuelle de *Saccharina sp.* a été estimée à 5,7 millions de tonnes, pour une valeur de 330 millions USD ou encore de 2,1 millions de tonnes d'*U. pinnatifida* pour une valeur de 0,9 milliard USD (Hans et al., 2021).

La **Figure 13** montre la distribution de plusieurs espèces de macroalgues brunes qui sont considérées comme des sources potentielles de PSS. *F. vesiculosus* est une macroalgue brune présente dans la mer du Nord, la mer Baltique occidentale, au niveau de l'océan Atlantique et l'océan Pacifique. Le genre *Ascophyllum* est constitué d'une seule espèce, *A. nososum*, confiné à l'océan Atlantique Nord. Cette espèce est largement distribuée et l'espèce la plus abondante (en biomasse) est retrouvée sur les côtes rocheuses de l'Atlantique Nord. Le genre *Laminaria* comprend plus de 30 espèces, principalement réparties le long des côtes tempérées froides et polaires des deux hémisphères Atlantique Nord-Est et Atlantique Nord-ouest. *Macrocystis*, forme une "forêt de varech" le long des régions côtières de l'est de l'océan Pacifique, de la Basse-Californie au sud-est de l'Alaska, les côtes de l'hémisphère sud, du Sud de l'Amérique, l'Afrique du Sud, la Nouvelle-Zélande, l'Australie et autour de nombreuses îles subantarctiques (Zayed et al., 2020).

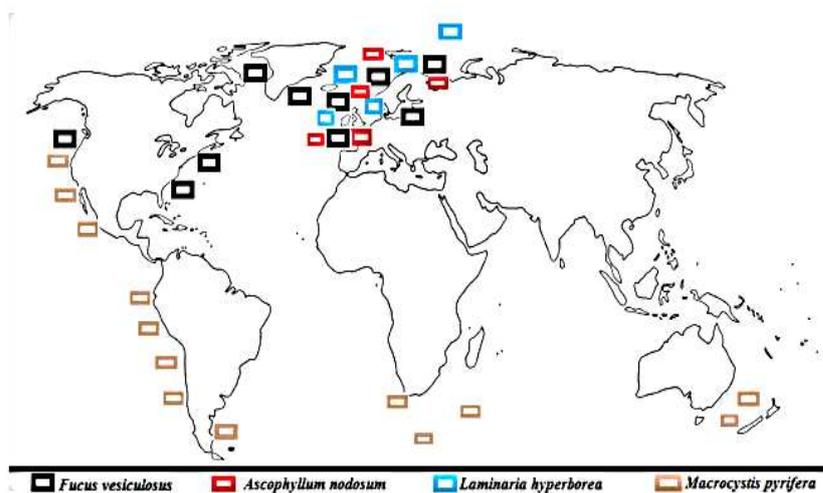


Figure 13. Distribution globale des macroalgues brunes (Zayed et al., 2020).

La plupart des hydrocolloïdes présents sur le marché remplissent au moins l'une des trois fonctions principales suivantes, en tant que (i) modificateur de formules physico-chimiques (par exemple, épaississant, stabilisant, liant ou émulsifiant dans les aliments pour animaux ou les produits cosmétiques), (ii) complément nutraceutique ou (iii) produit pharmaceutique. De

nombreux polymères sont vendus sous leur forme purifiée telle que l'héparine, les pectines, les carraghénanes, etc. En raison d'une demande accrue des consommateurs et d'une innovation rapide dans les domaines de l'alimentation humaine et animale, des cosmétiques et des technologies biopharmaceutiques, comme pour la plupart des produits naturels, les marchés des PS répertoriés sont en croissance. Cependant, cette croissance a été modifiée (positivement ou négativement) par les événements récents de la pandémie de COVID-19. Les gommes et les fibres végétales, ainsi que les phycocolloïdes d'algues, ont des volumes de ventes beaucoup plus élevés, mais des prix au kilogramme plus bas, compte tenu de la nature moins raffinée de ces polymères pour la plupart de qualité alimentaire (Drira et al., 2021). Un exemple d'un tel polymère est l'agar (E406), qui malgré son volume élevé de ventes en terme de quantité, représente une taille de marché estimée à 239 millions USD (en 2020) [9]. Il est utilisé comme agent gélifiant et stabilisant, et comme cryoprotecteur dans les industries alimentaire (80%) et pharmaceutique, cosmétique (20%) (Torres et al., 2019).

Les marchés de trois épaississants de qualité alimentaire les plus populaires avoisinaient en 2019-2020 le seuil des 1 milliard USD, à savoir les pectines (888 millions USD) [10], les alginates (728 millions USD) [11] et les carraghénanes (742 millions USD) [12]. Ces derniers, commercialisés sous leur forme native ou semi-raffinée en tant qu'additifs alimentaires (E-407 et E407a, respectivement), sont approuvés par l'Autorité européenne de sécurité des aliments. Ils présentent des masses molaires comprises entre 200 et 800 kDa (EFSA, 2018) et sont utilisés dans le secteur pharmaceutique (Ghorani et al., 2018) pour leurs propriétés anti-inflammatoire (De Sousa Oliveira Vanderle et al., 2011), antivirale (Hans et al., 2021), anticoagulante (Bind et al., 2018), immunomodulatrice (Yuan et al., 2006), antitumorale (Fedorov et al., 2013), antioxydante (Liu et al., 2020), anti-angiogénique (Cunha et al., 2016) ou encore neuroprotectrices (Bălașa et al., 2020).

Le marché mondial des alginates a été évalué à 728,4 millions USD en 2020 et devrait croître d'un taux annuel composé (TCAC) de 5,0% entre 2021 et 2028 pour atteindre une valeur de 1 074,4 millions USD [13]. En effet, les alginates commerciaux sont produits à partir de *L. hyperborea*, *L. digitata*, *Macrocystis pyrifera*, *A. nodosum*, *Ecklonia maxima*, *S. japonica*, *Lessonia nigrescens*, *Durvillea antarctica* et *Sargassum* sp. (Abka-Khajouei et al., 2022). Plusieurs études ont estimé que 23 000 tonnes d'alginate sont produites à partir d'environ 85 000 tonnes d'algues par an (Hrólfssdóttir et al., 2022). Ce marché connaît une croissance importante en raison d'une forte demande dans les applications alimentaires comme épaississant, émulsifiant et gélifiant. L'acceptation accrue des produits à base d'algues dans

l'industrie alimentaire et la demande croissante de leur utilisation comme ingrédients naturels sont les principaux moteurs de développement de production de ces produits. En outre, les subventions réglementaires reçues de diverses organisations telles que la Food & Drug Administration (FDA) des États-Unis et la Commission européenne à stimuler la croissance du marché mondial. À l'échelle mondiale, les États-Unis sont l'un des principaux marchés possédant une forte pénétration des produits à base d'algue essentiellement au niveau de leur industrie pharmaceutique [13].

Le propylène glycol est un ester d'acide alginique. C'est un stabilisant, épaississant et émulsifiant qui trouve des applications dans les industries pharmaceutique, alimentaire et cosmétique. Ce produit a dominé le marché avec une part de marché plus que 38% en 2020 et au même temps, il a eu l'approbation de la FDA en tant qu'additif alimentaire [13].

L'alginat de sodium occupe la deuxième position dans l'industrie alimentaire avec une part du marché de plus de 32% en 2020 [13]. Il est principalement utilisé dans la production des sauces, des crèmes fouettées, des gelées et d'autres vinaigrettes. Il améliore la stabilité des produits laitiers, ce qui explique la demande accrue de ce produit. En mars 2022, un groupe international de scientifiques de la Russie et de l'Inde ont créés des films d'emballage alimentaire comestibles à base du polymère naturel : l'alginat de sodium. Ce type de film d'emballage peut être utilisé pour protéger les légumes, les fruits et les produits carnés et se compose d'ingrédients entièrement naturels et est soluble dans l'eau. En janvier 2023, les développeurs de la German Biotech Company ont créé un revêtement à base d'algues qui est destiné à remplacer le plastique utilisé dans les emballages alimentaires [14].

Les alginates de calcium sont largement utilisés dans les applications pharmaceutiques telles que les soins des plaies et les pansements. Les fibres à base de calcium permettent l'accélération de la cicatrisation. En Amérique du Nord et en Europe, l'alginat de calcium est approuvé pour être utilisé comme agent anti-mousse dans l'industrie alimentaire. Il est utilisé comme épaississant pour augmenter la viscosité des produits alimentaires. L'alginat de potassium possède de nombreuses applications dans l'industrie pharmaceutique en raison de ses propriétés épaississantes et stabilisantes supérieures. Il contribue à la réduction des taux de sucre dans le sang et de cholestérol chez l'Homme, ce qui devrait accroître son application dans l'industrie pharmaceutique, soutenant ainsi la croissance du segment [14].

Les fucoïdanes et les laminarines occupent aussi une petite part du marché des PS algaux, soit environ 30 millions USD en 2020 et 2 millions USD en 2019, respectivement [7] et [8].

Le marché mondial des fucoïdanes devraient croître d'un TCAC de 8,08% entre 2022 et 2027. Ce marché connaît une croissance importante en raison de l'effet antiviral des fucoïdanes contre la COVID-19. L'évolution des modes de vie, la reprise des économies et le passage aux produits naturels ont été observés dans les économies en développement, entraînant une croissance de la demande des fucoïdanes, non seulement dans les aliments et les boissons les soins personnels et les produits pharmaceutiques, mais aussi dans d'autres secteurs industriels, y compris l'alimentation animale, les cosmétiques et la production de biocarburants [15].

À moyen terme, l'application croissante des fucoïdanes dans les suppléments nutraceutiques stimule principalement la croissance du marché à travers le monde. L'évolution des tendances de consommation et la demande croissante d'aliments et de régimes stimulant l'immunité ont créé des opportunités lucratives pour les fucoïdanes, avec un potentiel de croissance rapide au cours des prochaines années [16]. Dans la région Asie-Pacifique, les aliments fonctionnels constituent un domaine d'application majeur des fucoïdanes extrait d'algues. De plus, l'amélioration de l'immunité est la principale exigence pour que les consommateurs chinois qui utilisent des aliments fonctionnels ainsi que l'épidémie de maladies non infectieuses étant à l'origine de plusieurs problèmes de santé et même de décès a accru l'attrait des consommateurs pour l'achat d'aliment fonctionnels. De plus, en raison des avantages élevés des algues dans l'industrie des soins personnels, les acteurs de la région, en particulier dans les pays d'Asie du Sud-Est, ont commencé à investir dans la recherche et le développement des nouveaux produits naturels et à proposer une gamme de fucoïdanes car ils présentent des avantages cliniquement prouvés pour les applications de soin de la peau et dans les compléments de beauté. A titre d'exemple, en août 2021, BASF (Badische Anilin et Soda Fabrik) a introduit l'extrait d'algues afin de rafraîchir et revitaliser le contour des yeux qui est appelé Seanactiv. Ce produit exploite le pouvoir des fucoïdanes extraits de *F. vesiculosus* pour limiter les signes visibles du vieillissement et de la fatigue autour des yeux [17].

II. Généralités sur les polysaccharides

La glycomique est la science qui étudie les glucides et s'intéresse à leur identification structurale et fonctionnelle. Les glucides ou PS sont les molécules biologiques les plus abondantes dans la nature de formule brute $(CH_2O)_n$, usuellement nommé hydrates de carbone. On distingue deux catégories, à savoir les oses ou monosaccharides et les osides qui correspondent à des polymères complexes constitués de plusieurs oses liés entre eux par des liaisons de type *O*-glycosidique. Les glucides sont omniprésents dans le monde vivant

(procaryotes et eucaryotes). Leur biosynthèse se fait par la voie de glycogénèse ou la photosynthèse. Ils peuvent être associés à d'autres molécules, tels que des peptides/protéines ou des lipides pour former les glycoprotéines et les glycolipides, respectivement. La présence d'autres groupements aglycones (inorganique) ou des groupements organiques au niveau des polymères glucidiques confère une diversité structurale qui est à l'origine de différentes propriétés physico-chimiques et biologiques (Chouana et al., 2017). De ce fait, le développement d'approches et d'outils analytiques constituent un défi pour résoudre les structures complexes des glucides, identifier de nouveaux PS et comprendre leurs mécanismes d'actions.

II.1. Biochimie des glucides

Les glucides sont des biopolymères ubiquitaires complexes existant dans la nature (**Figure 14**). Les glucides peuvent se trouver sous forme des polyhydroxycétones ou sous forme des polyhydroxyaldéhydes qui peut renfermer jusqu'à sept atomes de carbone (Quentin et al., 2015). Selon la nomenclature internationale IUPAC-IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry) (McNaught et al., 1996), les osides sont classés selon leurs degrés de polymérisation en deux différentes catégories qui sont (i) les oligosaccharides qui peuvent être soit des oligosides soit des oligoholosides et qui possèdent un degré de polymérisation (DP) entre deux et dix et (ii) les PS qui peuvent être soit des polyholosides soit des polyosides ou des glycanes caractérisés par un DP supérieur à dix. L'assemblage de deux monosaccharides induit la formation putative de 12 liaisons glycosidiques expliquant la richesse et la diversité structurale des glycanes. Ils se différencient non seulement le type de liaisons glycosidiques dans leurs structures et leurs unités monosaccharidiques, mais aussi par la longueur de leurs chaînes ou leurs degrés de ramifications.

On distingue deux types de PS soit les homopolysaccharides qui ne contiennent qu'un seul type d'unité répétitive telle que l'amidon et la cellulose qui sont constitués seulement de glucose soit les hétéropolysaccharides contiennent deux ou plusieurs types de monosaccharides différents à savoir des oses neutres et/ou des oses acides telle que les galactomannanes formés par le galactose et le mannose. Cette forte variabilité est renforcée par la présence des groupements chimiques non osidiques greffés sur le squelette polysaccharidique tels que les acides organiques (groupements acétyle, pyruvyle ou succinyle) ou les esters d'acide sulfurique

qui se trouvent principalement dans les PS d'origine marine (Raveendran et al., 2013 ; Wang et al., 2022)

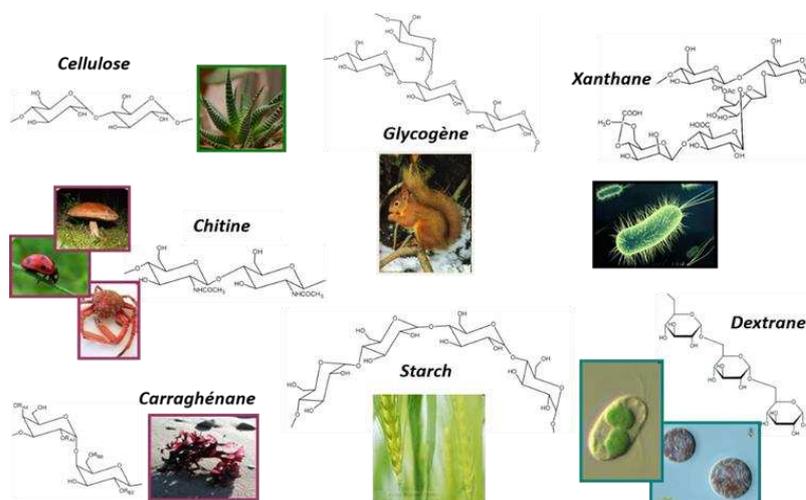


Figure 14. Ubiquité des polysaccharides dans le monde vivant, quelques exemples.

Les polysaccharides sont nommés par leur monosaccharide majoritaire accompagné par un suffixe « ane » telle que les fucanes qui sont constitué majoritairement de fucose. Si les PS sont constitués de plusieurs types de monosaccharides, les unités osidiques les plus minoritaires seront associés par la suite à ce nom (Hentati et al., 2018). À titre d'exemples, les galactofucanes sont composés d'une chaîne principale contenant du fucose comme ose majoritaire et substitué par des résidus de galactose. Enfin, l'hydrolyse des PS par des acides ou des enzymes régio-spécifiques telle que les hydrolases et les lyases conduit à la libération de différentes monosaccharides et/ou oligosaccharides constitutifs des biopolymères.

Les fonctions physiologiques des PS dépendent fortement des fonctions et des propriétés des PS et des modes de liaison : on parle de relation structure/fonction. Certains PS jouent un rôle de stockage du carbone et de l'énergie telles que l'amidon, le glycogène ou les laminarines. D'autres sont des éléments structuraux, comme la chitine formant les exosquelettes des champignons ou la cellulose chez les plantes. Plus récemment, certains PS ont également été identifiés comme composés bioactifs et appelés PS bioactifs. Cette définition fait référence aux PS ayant des effets biologiques sur les organismes vivants (Pirsa et al., 2022).

II.1.1 Les polysaccharides d'origine végétale (plantes)

Les végétaux, incluant les plantes supérieures et les algues, sont caractérisés par une forte richesse en PS, qui peuvent y jouer de nombreux rôles. Ainsi, on peut distinguer les PS

structuraux, de réserve et les PS des exsudats et les mucilages (**Figure 15**). Les PS structuraux regroupent les PS fibrillaires qui se présentent essentiellement sous forme de cellulose et d'hémicellulose ainsi que la famille des pectines (neutres et acides). Les PS de réserves se présentent sous plusieurs formes à savoir l'amidon ou encore les galactomannanes chez les végétaux supérieurs. Les exsudats et les mucilages des plantes supérieures correspondent en générale à des types de gomme, e.g. arabique, ou sont parfois de type xylanique (Choudhury et al., 2022) (**Figure 16**). Ces différents PS sont répartis de façon homogène au niveau de la paroi cellulaire (**Figure 15**).

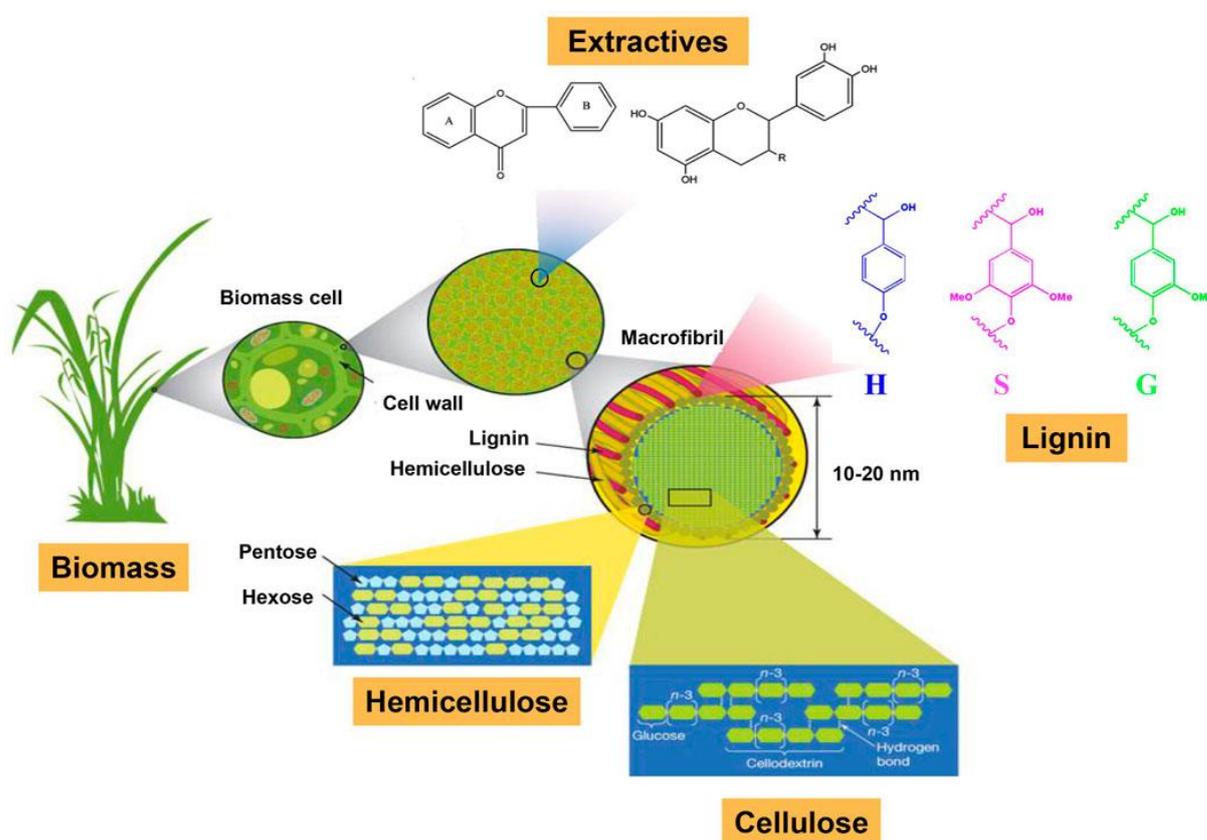


Figure 15. Répartition des polysaccharides de la paroi cellulaire (Potters et al., 2010).

La cellulose se trouve sous forme de microfibrilles ayant une orientation transversale qui constituent des réseaux irréguliers assurant la rigidité des parois cellulaires. Ce polymère est caractérisé par son abondance, constituant jusqu'à 50% de la biomasse végétale. Elle est composée d'une succession de D-glucose liés par des liaisons β (1,4) (**Figure 17**). Sa voie de synthèse s'effectue grâce à différentes celluloses synthases cytoplasmiques (Somerville et al., 2006).

Les hémicelluloses, comme les celluloses, participent au maintien de la structure cellulaire des parois végétales. Ils sont composés de plusieurs monomères à savoir le glucose, le mannose, le xylose liés entre eux par des liaisons de type β -(1,4) associés aussi à des chaînes latérales qui contiennent différents oses comme le glucose, le galactose, l'arabinose, le mannose, le xylose, le rhamnose et différents acides uroniques (**Figure 17**). Les hémicelluloses peuvent se trouver soit sous la forme d'hétéropolymères (glucomannane) ou sous la forme d'homopolymères (mannanes, xylanes, β -glucanes) (**Figure 16**). Leurs synthèses s'effectuent dans l'appareil de Golgi par des glycosyltransférases (Kloareg et al., 2021). Parmi les hémicelluloses, les xylanes sont les plus abondants, constitués d'un enchaînement de monomères de D-xylose liés par des liaisons β -(1,4), pouvant être ramifiés en positions C₂ et/ou en C₃ (Amidon et al., 2011) (**Figure 18**).

Les glucanes représentent une deuxième partie des hémicelluloses, appelés aussi xyloglucanes. Ils sont formés par un squelette principal composé de β -(1,4)-D-glucose et ramifié en O-6 par des chaînes latérales composées de résidus xylose liés en α -(1,6), de résidus β -(1,2)-D-galactose ou encore par des dimères de type α -L-fucosyl- β -(1,2)-D-galactose (Fuc-Gal). Ces xyloglucanes constituent 20% de la biomasse des plantes et se trouve essentiellement au niveau de leurs parois (Fry et al., 2008) (**Figure 19**).

La troisième classe des hémicelluloses correspond aux mannanes, incluant les galactomannanes, glucomannanes et galactoglucomannanes (**Figure 20**). Le galactomannane est composé par une chaîne principale de résidus mannose liés en β -(1,4) et ramifiés par des résidus α -galactose. Les galactoglucomannanes sont quant à eux composés d'une chaîne principale de résidus D-glucose et D-mannose liés en β -(1,4) et de chaînes latérales de résidus D-galactose liés en β -(1,4) en position O-6 ainsi que des groupement acétyles en position O-2 et O-3 (Chouana et al, 2017) (**Figure 20**).

La pectine est un autre hétéropolysaccharide présent dans les parois cellulaires végétales. Une partie des pectines est un homopolymère linéaire d'acide galacturonique liée par des liaisons de type α -(1,4). L'homogalacturonane (HG) est partiellement méthyl-estérifié au niveau du carbone C-6, peut être O-acétylé en position O-2 ou O-3 et peut contenir d'autres esters potentiellement réticulant de structure incertaine (Ognyanov et al, 2016). Il a été démontré que les régions HG pouvaient atteindre environ 100 résidus d'acide galacturonique, même si des régions plus courtes semblent pouvoir s'intercaler (Yapo et al., 2007). Les pectines sont également constituées de structures plus complexes, plus ou moins substituées, tels que les

rhamnogalacturonanes de type I (RG-I), de type II (RG-II), ou encore des xylogalacturonanes (XGA) ou apiogalacturonanes (AP) (Harholt et al., 2010) (**Figure 21**).

Par ailleurs, plusieurs structures polysaccharidiques servent de structures de réserve chez les plantes supérieures au niveau des bulbes, des racines et des graines, dont principalement l'amidon, les mannanes et les fructanes. L'amidon est la principale substance stockée par les végétaux, et le plus répandu, suivi par les fructanes et les PS de la paroi cellulaire (galactomannanes, xyloglucanes et galactanes) (Wang et al., 2023). Cette classification repose essentiellement sur la structure, les mannanes étant également subdivisés en mannanes purs, glucomannanes et galactomannanes.

L'amidon est composé d'amylose, qui est un PS linéaire, et d'amylopectine, qui est un PS ramifié. Les deux formes sont des polymères d' α -D-glucose. L'amidon naturel contient 10 à 20% d'amylose et 80 à 90% d'amylopectine. L'amylose forme une dispersion colloïdale dans l'eau chaude alors que l'amylopectine est complètement insoluble. Les molécules d'amylose sont des homopolysaccharides linéaires sont composées de 200 à 20 000 unités de glucose liées en α -(1,4) formant une structure en hélice en raison des angles de liaison entre l'unité de glucose alors que les molécules d'amylopectine sont composées d'environ deux millions d'unités de glucose. Les branches de la chaîne latérale de l'amylopectine sont constituées d'environ 30 unités de glucose attachées avec des liaisons α -(1,6) environ toutes les 20 à 30 unités de glucose le long de la chaîne (Araújo et al., 2022) (**Figure 22**).

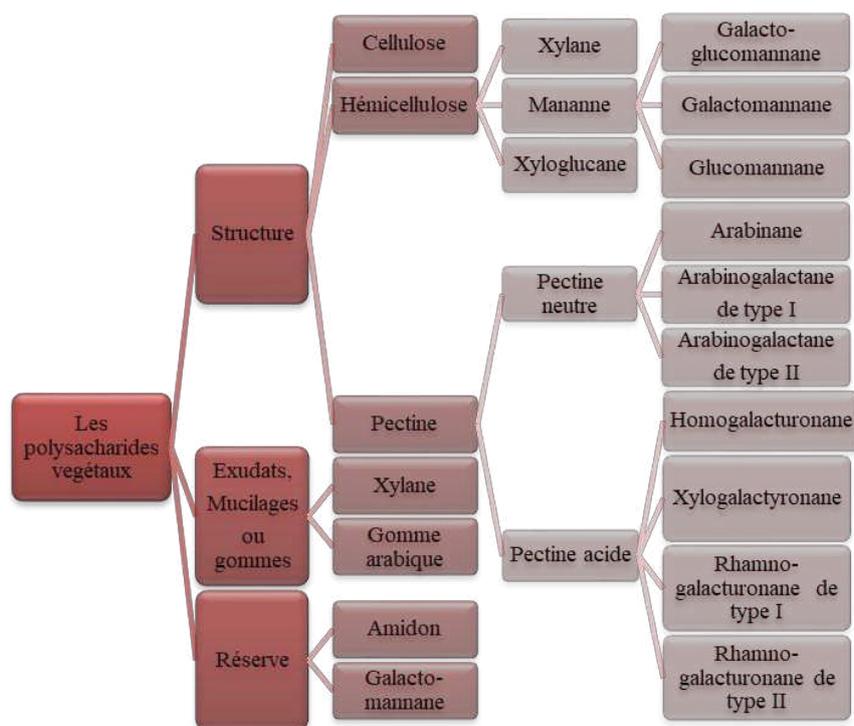


Figure 16. Les polysaccharides d'origines végétales (plante supérieure).

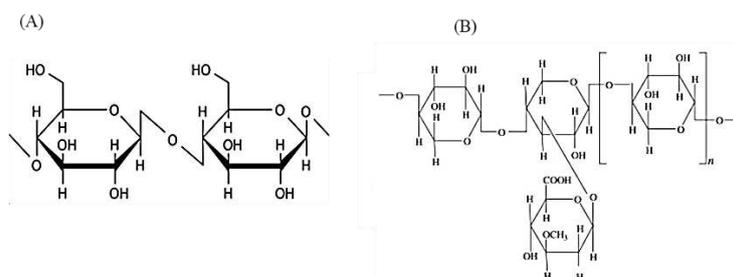


Figure 17. Structures de (A) la cellulose et (B) des hémicelluloses.

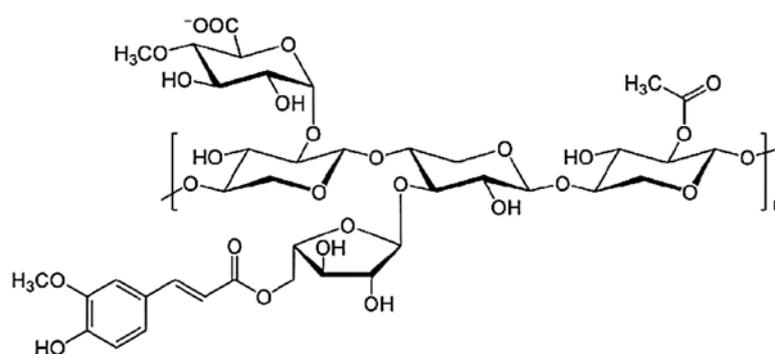


Figure 18. Structure du xylane.

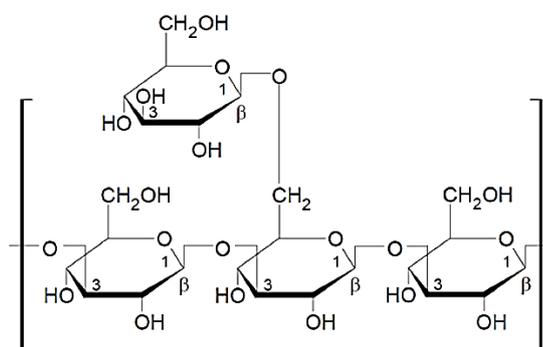


Figure 19. Structure du β-glucane.

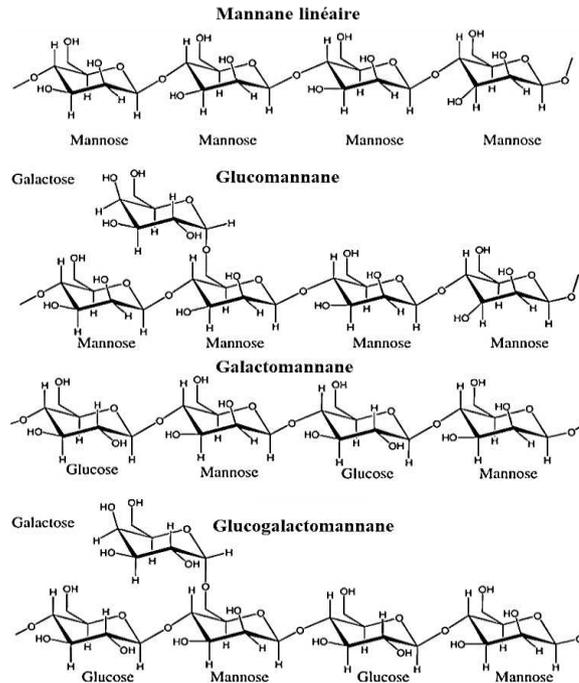


Figure 20. Structures des différents types de mannanes.

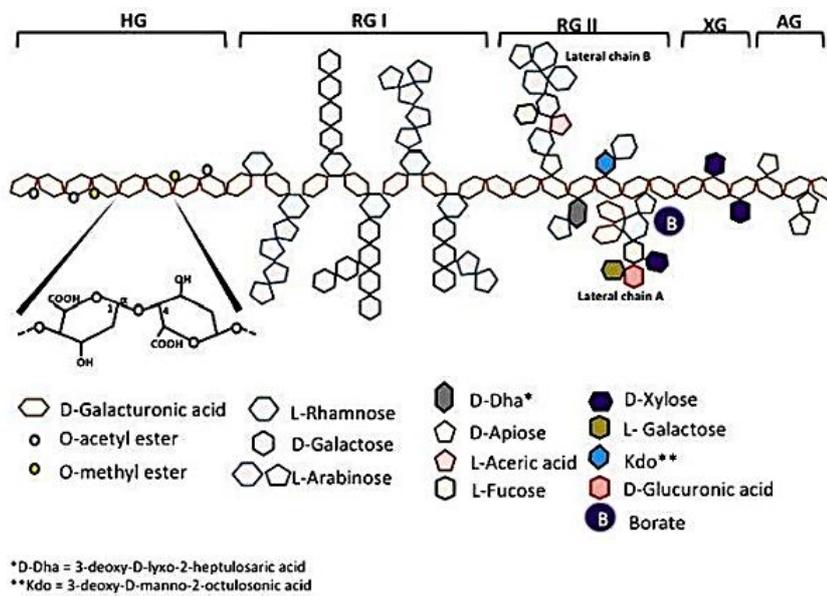


Figure 21. Structure des pectines, HG homogalacturonane, RG : rhamnogalacturonane, XG : xylogalacturonane, AG : arabinogalacturonane.

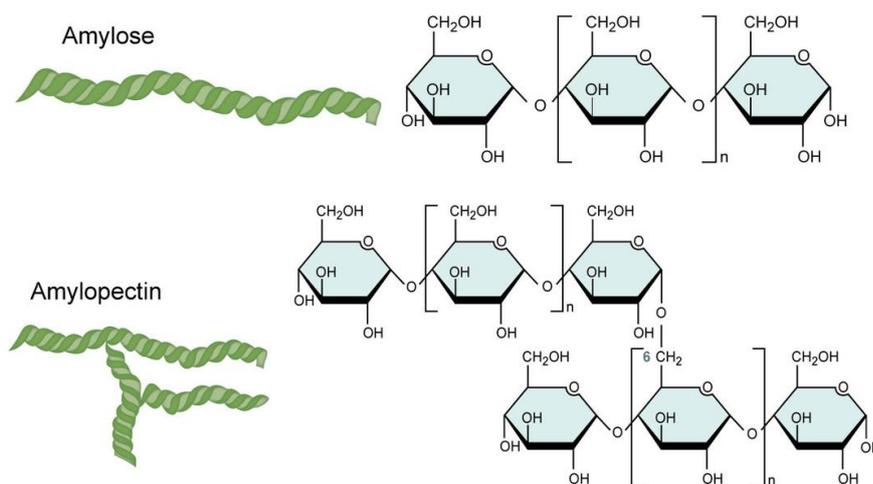


Figure 22. Structure de l'amylose (A) et l'amylopectine (B).

II.1.2. Les polysaccharides d'origine macroalgale

Les cellules des macroalgues sont caractérisées par la présence d'une paroi polysaccharidique formée d'une phase cristalline et d'une phase amorphe (Hentati et al., 2020). La phase cristalline est composée essentiellement de cellulose formant ainsi le squelette de la membrane. Elle est homologue chez toutes les macroalgues. Tandis que la phase amorphe, dite aussi phase matricielle, est spécifique de chaque classe d'algues. La majorité des PS d'origine algale, constituants de la phase amorphe, sont des hétéropolysaccharides pouvant renfermer différents substituants de nature variable, y compris des composés organiques tels que des groupements méthyl- ou pyruvyl- liés, respectivement, par des liaisons de type éther ou acétal ou encore des substituants inorganiques comme des groupements sulfate liés par des liaisons ester. Ces substituants participent à la diversité des propriétés physico-chimiques des PS de macroalgues. A titre d'exemple, la présence de PSS contribue à la capacité d'hydratation des algues alors que la présence de la cellulose et des alginates confère une résistance mécanique aux thalles (Hentati et al., 2020). Les PS algaux sont classés en PS de réserves et pariétaux (**Figure 23**).

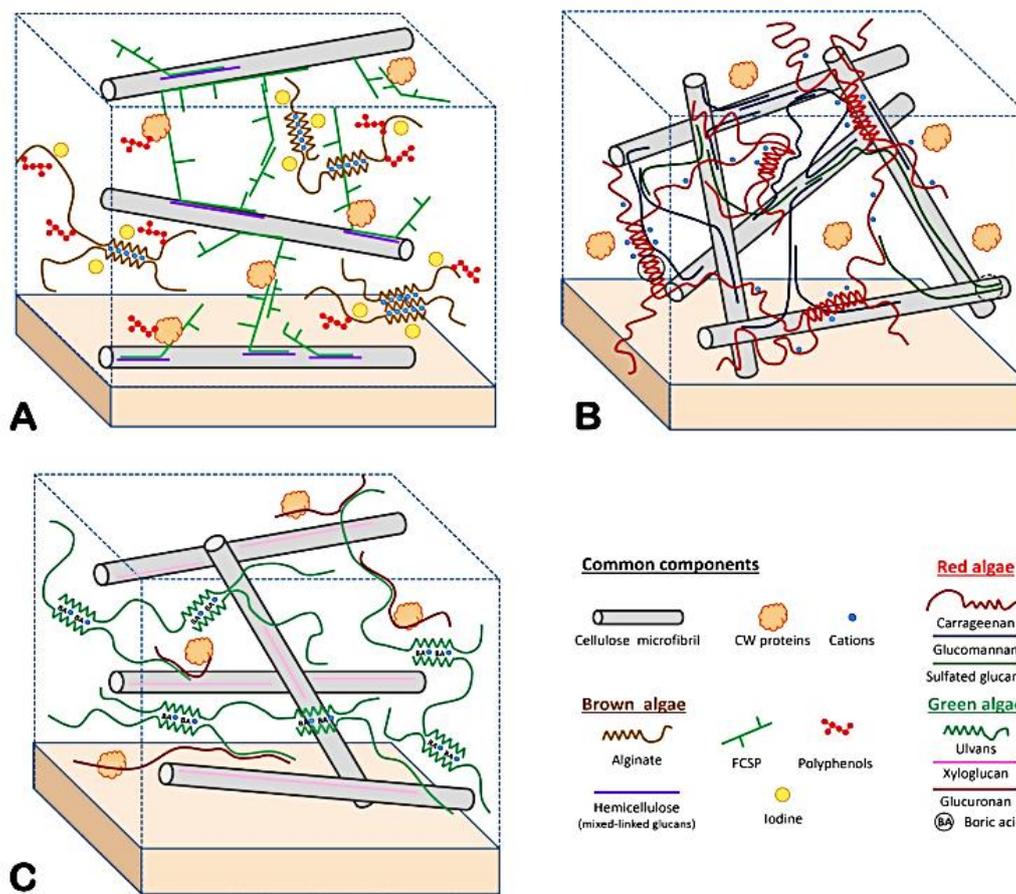


Figure 23. Modèles d'organisations des parois cellulaires (Kloareg et al., 2021) (A) des macroalgues brunes (B) des macroalgues rouges (C) des macroalgues vertes.

II.1.2.1. Les polysaccharides de réserve

A l'issue du processus photosynthétique, les glucides synthétisés sont stockés sous forme de polymères et jouent un rôle dans l'équilibre du métabolisme des macroalgues. Selon les espèces, la structure de ces polymères varie. En effet, les algues vertes produisent des PS de réserve ayant une structure homologue de l'amidon, un enchainement de α -(1,4)-D-glucane et de α -(1,6)-D-glucane (Kornprobst et al, 2005). Chez les algues rouges, les PS de réserve correspondent à des β -(1,3)-D-glucane. Chez les algues brunes, les laminarines sont composés d'unités β -(1,3)-D-glucopyranose ramifiées par des chaînes de β -(1,6)-D-glucose. Ces laminarines existent sous deux formes, soit de série M (D-mannitol en position terminale), soit de série G (D-glucose en position terminale), et peuvent être solubles ou insolubles (Kornprobst et al, 2005 ; Jönsson et al., 2020) (**Figure 24**). En outre, le mannitol et le laminitol constituent une source d'énergie (réserve énergétique) utilisable par les algues brunes (Hentati et al., 2020).

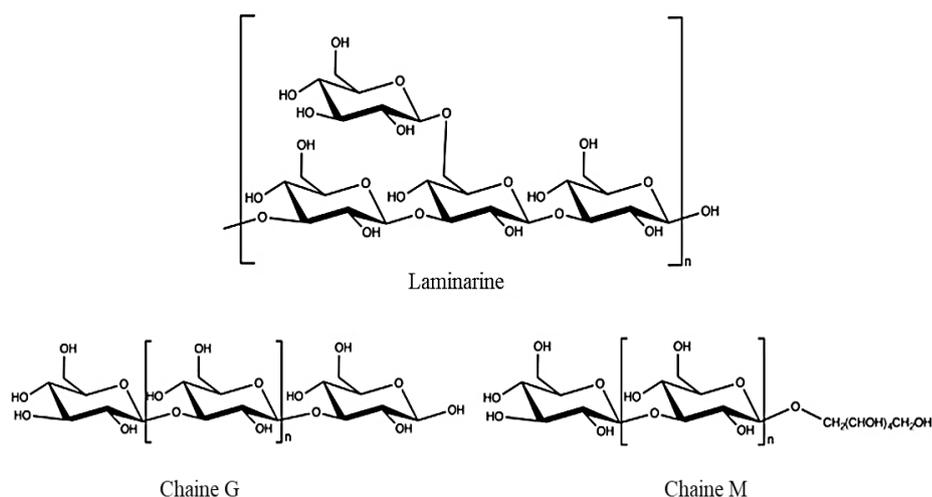


Figure 24. Structure des différents types de laminarines.

II.1.2.2. Les polysaccharides pariétaux

Ce sont des PS de structure qui peuvent être divisés en deux types à savoir des PS fibrillaires et matriciels (**Figure 25**). Les chlorophycées possèdent une teneur très élevée en cellulose (jusqu'à 70%) par rapport aux Phéophycées et aux Rhodophycées (20% et 10%, respectivement) (Zanchetta et al., 2021). Chez les algues rouges, des chaînes de mannane et de cellulose peuvent s'associer à d'autres polymères, par exemple des β-(1,3) et β-(1,4)-D-xylanes et β-(1,4)-D-mannanes pour former un squelette rigide au sein des microfibrilles (Rodríguez-Gacio et al., 2012).

II.1.2.3. Les polysaccharides matriciels

La phase matricielle des algues est plus complexe que la phase fibrillaire. Cette phase est constituée de mucilage hydraté, dans certains cas associés à des protéines. La composition de cette phase en PS est spécifique de l'espèce. La **figure 25** illustre les types de PS matriciels identifiés parmi différentes espèces de macroalgues.

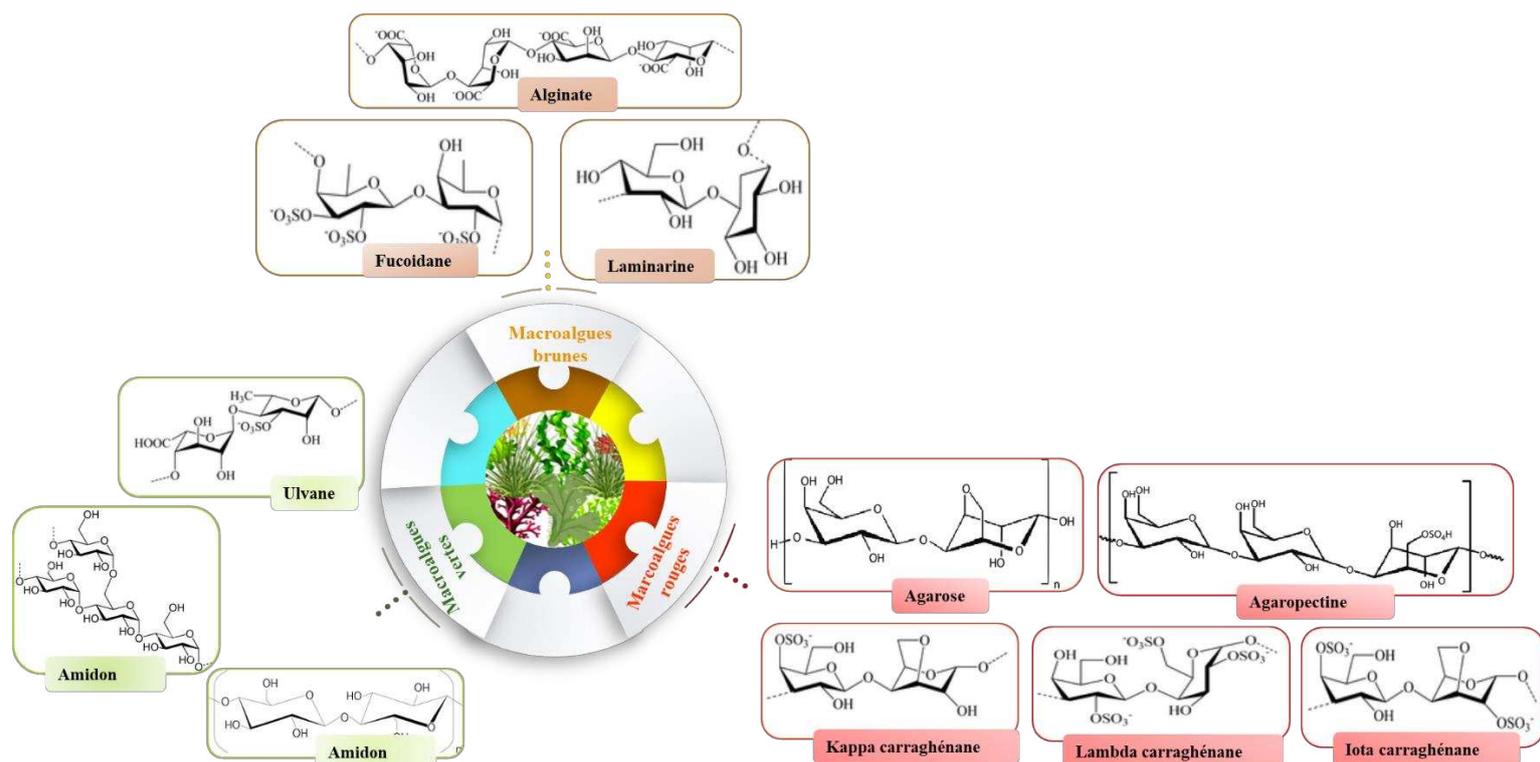


Figure 25. Structures des polysaccharides matriciels des macroalgues vertes, rouges et brunes.

II.1.2.3.1. Les polysaccharides matriciels des algues vertes

Les PS hydrosolubles des algues vertes sont principalement les ulvanes (**Figure 25**), extraits des Ulvales (*Ulva* et *Enteromorpha* sp.). Ils sont caractérisés par leur complexité et leur hétérogénéité et sont composés essentiellement par des unités disaccharidiques de type 4-β-D-glucuronosyl-(1,4)-α-L-rhamnose-3-sulfate, appelés aussi acide aldobiouronique (Lahaye et al., 2007 ; Wang et al., 2014). Cette chaîne principale peut être ramifiée par des résidus de rhamnose, xylose, glucose, acides iduronique et glucuronique (Meinita et al., 2022). Certaines macroalgues vertes, dont le genre *Codium*, sont caractérisées par leur contenu en galactanes sulfatés. A titre d'exemple *C. fragile* et *C. cylindricum* secrètent des arabinogalactanes sulfatés ainsi que des glucogalactanes sulfatés (Meinita et al., 2022).

II.1.2.3.2. Les polysaccharides matriciels des algues rouges

Deux types majeurs de PS gélifiants et texturants, à savoir les agars et les carraghénanes, caractérisent glucides extractibles des algues rouges (**Figure 25**). Ces deux polymères possèdent un squelette linéaire constitué par une alternance régulière des unités 3-β-galactose (unité A) et 4-α-galactose (unité B) (Delattre et al., 2011). Ces deux polymères peuvent avoir différentes substitutions au niveau de leurs structures dont des groupements sulfate, méthyle, pyruvate par exemple. Les carraghénanes peuvent être hautement sulfatés (jusqu'à 50%) en

comparaison aux agaroides (8% maximum), tandis que les agars peuvent être quant à eux hautement méthylés (Madera-Santana et al., 2011).

Les carraghénanes sont des PS de hautes masses molaires (260 à 1 400 kDa). Ces polymères sont composés d'un enchaînement d'unités galactopyranoses alternativement liées en α -(1,3) et β -(1,4). Les unités liées en β sont toujours de configuration D, tandis que les unités liées en α sont de configuration D dans le cas des carraghénanes et L dans le cas des agars. Les carraghénanes peuvent être classés en fonction des différences de leur masse moléculaire moyenne, du nombre et de la position des groupes ester de sulfate et de la présence d'un cycle anhydre 3,6 dans l' α -galactose (Hentati et al., 2020). Les trois types ayant une importance commerciale plus élevée, à savoir κ -, ι - et λ -carraghénane, sont présentés dans la **figure 26**.

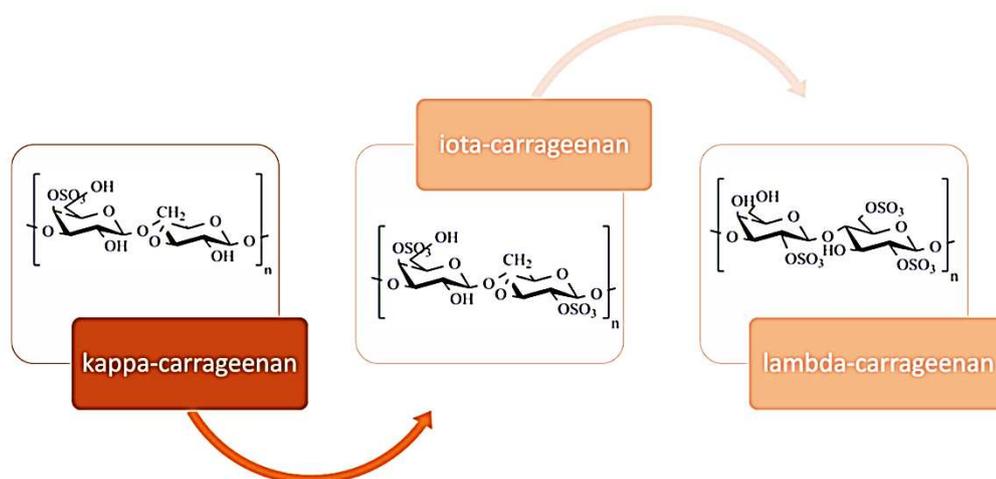


Figure 26. Unités répétitives dans les trois principaux types des carraghénanes présentant un intérêt commercial (Torres et al., 2019).

L'agar est un PS linéaire composé par deux polymères glucidiques l'agarose et l'agaropectine (**Figure 27**). La structure moléculaire des PS d'agar, en particulier le type et l'emplacement des esters de sulfate, semble être spécifique à l'espèce (Hentati et al., 2020). L'agarose est un PS linéaire neutre composé de β -D-galactose liés et de 3,6-anhydro- α -L-galactose. L'agaropectine est un PS acide contenant des groupements sulfates, de l'acide pyruvique et de l'acide D-glucuronique conjugué en agarobiose. L'agarose représente jusqu'à 70% du mélange et est responsable de la gélification, tandis que l'agaropectine est responsable des caractéristiques d'épaississement. Différentes molécules d'agarose dérivées peuvent être obtenues par dégradation chimique ou enzymatique. La plupart des produits d'hydrolyse correspondants sont des agaro-oligosaccharides (AOS), des néo-agaro-oligosaccharides (NAOS), le néo-agarobiose (NAB) et le 3,6-anhydro-L-galactose (1-AHG) présentant des activités biologiques (Yun et al., 2013).

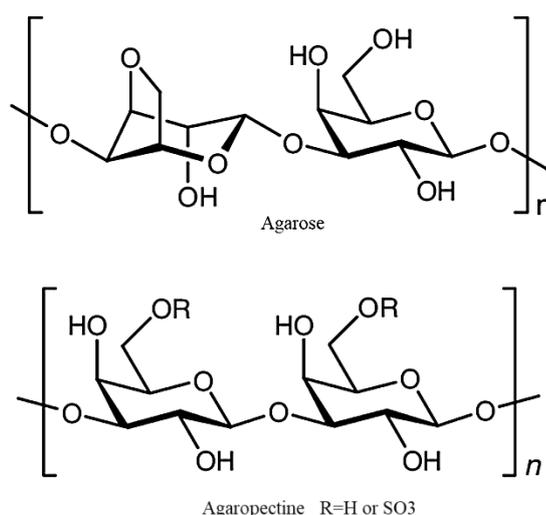


Figure 27. Structure de l'agarose et de l'agaropeptine.

II.1.2.3.3. Les polysaccharides matriciels des algues brunes

Les Phéophycées produisent plusieurs PS dont notamment les alginates et les fucoïdanes (**Figure 28**). On y inclue également les ascophyllanes et sargassanes (Collic Jouault et al., 1990). Les alginates occupent une grande partie du mucilage matriciel des Phéophycées, représentant de 18 à 66% du poids sec des laminaires et des fucus. Ce sont des polymères linéaires composés par un enchainement d'acide β -D-mannuronique rarement acétylé liée en (1,4) avec l'acide α -L-guluronique. Ces alginates peuvent exister sous forme (i) d'homo-blocs constitués seulement par des résidus α -L-GulA (blocs G) ou par des résidus β -D-ManA (blocs M), (ii) de blocs où les motifs M et G alternent (MG). Le rapport M/G peut varier en fonction des espèces, de l'âge, des tissus et des conditions biotiques (Gacesa et al., 1988). Les alginates sont caractérisés par leur masse moléculaire (M_w , M_n), leur indice de polydispersité (M_w/M_n), leur paramètre macromoléculaire (par exemple, la viscosité intrinsèque ($[\eta]$), la concentration critique (C^*), les rayons hydrodynamique (R_h) et de giration (R_g)) et leur rapport M/G. Le nombre et la longueur des fréquences monades (G et M), diades (GG, MM, MG ou GM) et triades (MMG, GGM, MGM) fournissent des informations structurales facilement corrélées avec leurs propriétés rhéologiques (gélifiantes et/ou épaississantes) en solution ou en présence de sels monovalent (K^+ , Na^+) et divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) (Hentati et al., 2018). L'arrangement des blocs G et M dans les alginates, selon leur source naturelle, peu être (i) séquentiel en formant des homopolymères composés par des unités répétitives de blocs GGGG ou MMMM, ou (ii) alterne en formant des hétéropolymères

(GMGMGMGM) ou (iii) aléatoire (Fernando et al., 2020). Ces facteurs affectent les propriétés fonctionnelles des alginates, leurs solubilités, leurs réactions avec les ions métalliques, leurs viscosités et leurs propriétés gélifiantes (Bertagnolli et al., 2014). Les hétéroblocs (MG) sont plus flexibles que les homo-blocs GG. Ils sont aussi plus solubles à des pH bas en comparaison avec les poly-M, en ayant des pKa de l'ordre de 3,38 en comparaison aux poly-G qui possèdent des pKa de l'ordre de 3,65. De ce fait, la teneur en unités mixtes influe la stabilité des alginates. Les blocs poly-M fournissent une flexibilité au squelette alginique, alors que les blocs poly-G donnent des conformations structurelles peu mobiles et confèrent une rigidité de la molécule d'alginate. Les propriétés rhéologiques des alginates (gélifiantes et/ou épaississantes) dépendent essentiellement de la composition de ce polymère en homo-blocs et en hétéroblocs en définissent non seulement leurs potentiels physico-chimiques et biologiques mais aussi leurs utilisations. Les gels préparés à partir d'alginates de faible poids moléculaire, possédant des unités élevées en G sont les gels les plus solides et les meilleurs pour l'encapsulation. On les utilise par exemple pour protéger les probiotiques (Liu et al., 2019). La porosité du gel augmente d'ailleurs avec une teneur élevée en monomère G, le gel formé étant également moins sensible au rétrécissement (Donati et al., 2009) (**Figure 29**).

La résistance du gel dépend également du degré d'interaction de l'alginate avec le cation divalent et du rayon ionique. Par exemple, les ions Ba^{2+} sont plus susceptibles de réagir avec les alginates que les ions Ca^{2+} . Les ions Ba^{2+} se lient aux blocs M et G, mais les ions Ca^{2+} peuvent se lier aux blocs G et MG. Par conséquent, les ions Ba^{2+} produisent un gel plus fort que ceux de Ca^{2+} (Ching et al., 2017). D'après la littérature, les alginates extraits des espèces trouvées dans les eaux chaudes peuvent être très utiles dans le cas de formation de gels forts. De plus, les alginates extraits à partir des espèces trouvées dans les eaux froides ont souvent une faible viscosité (De Silva et al., 1984). Plusieurs études ont montré que les algues de printemps étaient la source la plus riche pour l'extraction d'alginates ayant un rapport M/G < 1 (Bertagnolli et al., 2014). Par conséquent, l'alginate extrait avec cette propriété convient à l'obtention des gels de résistance alimentaire et à certaines applications industrielles (Bertagnolli et al., 2014) (**Figure 29**). Aussi, il a été constaté dans d'autres études que le rapport M/G est plus élevé dans les parties basales que la partie centrale, apicales et marginale de la macroalgue *S. japonica*. Cela signifie probablement que la partie de base (comprenant

le point de croissance de *S. japonica*) synthétise toujours l'acide mannuronique, qui est progressivement échangé par des unités G avec le vieillissement et l'allongement de la lame par épimérisation (Minghou et al., 1984).

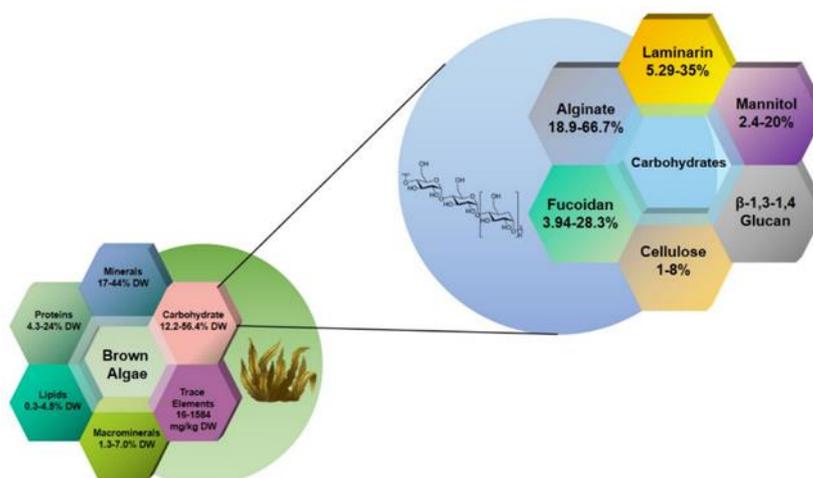


Figure 28. Caractéristiques principales des compositions et polymères extractibles des macroalgues brunes (Li et al., 2021).

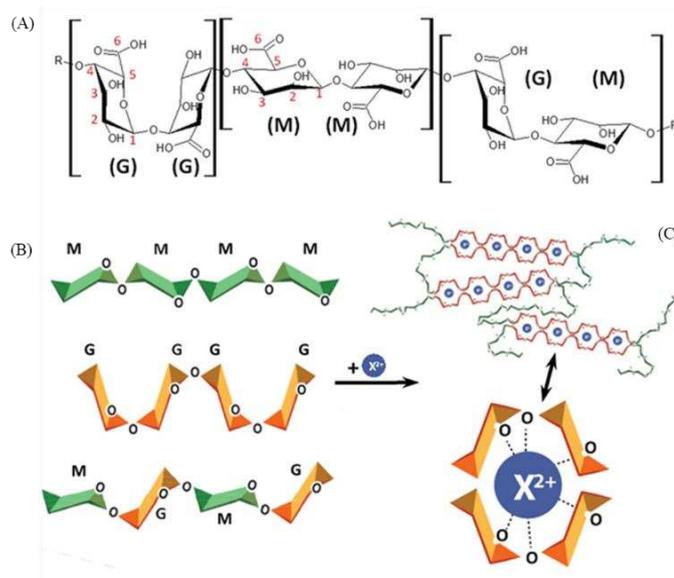


Figure 29. Schéma des unités d'acide mannuronique (M) et gulonique (G) (A), représentations schématiques d'une chaîne d'acide alginique constituée de blocs MM, GG et MG (B) et d'un modèle « boîte à œufs » (C) (Urbanova et al., 2019).

Les fucoïdanes constituent un groupe hétérogène de PSS formés essentiellement par une chaîne principale de L-Fucp (< à 90%). Les autres monosaccharides présents sont représentés dans des proportions variables, à savoir des acides uroniques mais aussi des résidus neutres comme le galactose, le glucose, le xylose, le mannose, le rhamnose, l'arabinose, sans oublier la

présence éventuelle de groupements acétyl (Wijesinghe et al., 2012). Les fucoïdanes se diffèrent des fucanes qui sont extraits à partir des invertébrés vivant dans des milieux marins, et qui présentent une forme linéaire constituée d'unités répétitives de L-Fucp associé avec peu d'autres monosaccharides (moins de 10%).

La composition et la complexité des fucoïdanes varient selon les différentes espèces de macroalgues brunes et sont largement influencés par la localisation géographique et les variations saisonnières (Yu et al., 2021). Bien que les fucoïdanes n'aient pas de structure chimique universelle (Zayed et al., 2020), plusieurs études suggèrent principalement deux types structuraux de fucoïdanes : (i) les fucoïdanes de type I dont la chaîne principale est composée d'unités α -L-fucose liées en (1,3) et (ii) les fucoïdanes de type II dont la chaîne principale est composée d'unités répétitives d' α -L-Fuc liées en (1,3)- et (1,4) (Usoltseva et al., 2019) (**Figure 30**). Les macroalgues de l'ordre des Chordariales et des Laminariales produisent des fucoïdanes de type I, tandis que celles appartenant à l'ordre des Fucales contiennent des fucoïdanes de type II (Chevolot et al., 2001). Les groupements sulfates liés au fucose chez les fucoïdanes de type I se trouvent en positions C-2 et C-4, alors qu'ils sont positionnés en C-2, C-3 et C-4 chez les fucoïdanes de type II (Gotteland et al., 2020) (**Figure 30**).

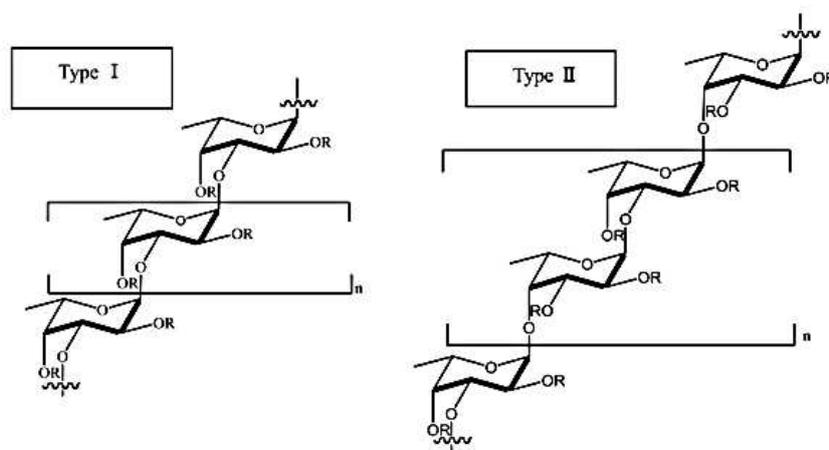


Figure 30. Structure générale des fucoïdanes des macroalgues brunes. R peut être une unité de fucopyranose, acide glucuronique ou un groupement sulfate, tandis que la localisation du galactose, mannose, xylose, rhamnose, arabinose et glucose dans plusieurs types d'espèces d'algues restent inconnus (Luthuli et al., 2019).

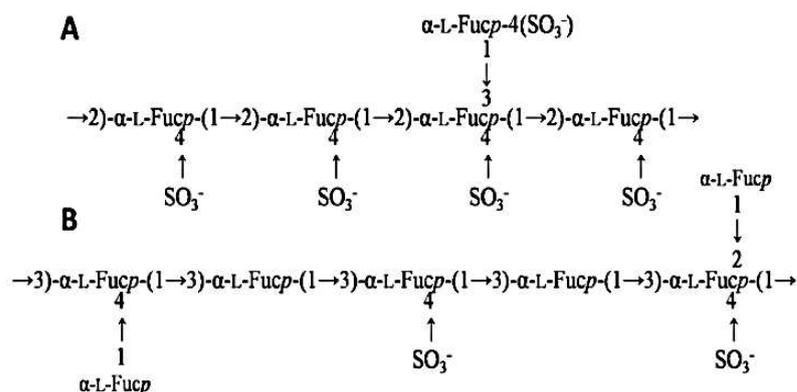


Figure 31. Structures des fucoïdanes isolé de *F. vesiculosus* (A) α-(1,2)-L-fucane (B) α-(1,3)-L-fucane

D'autres études suggèrent l'existence d'autre types de fucoïdanes extraient des macroalgues brunes, le fucoïdane isolé de *Chorda filum* contient un squelette poly-α-(1,3)-fucopyranoside avec un degré de ramification élevé, composé principalement d'unités α-(1,2)-Fucp. Certains résidus de fucopyranose sont sulfatés principalement en O-4 et O-2. Néanmoins, le fucopyranose lié en α-(1,2) ou en α-(1,4) peut également être trouvé dans certaines algues brunes (Nishino et al., 1991). Les fucoïdanes d'*Himanthalia lorea* et de *Bifurcaria bifurcata* ont des résidus fucose lié en α-(1,2) et en α-(1,3) avec sulfatation en position C-4. Les résidus d'acide glucuronique et xylose sont liés en α-(1,4) et sont non sulfatés. Ils sont d'ailleurs à la périphérie des molécules hautement ramifiées (Mian et al., 1973). L'acide glucuronique, le mannose et le glucose dans le fucoïdane de *Padina pavonia* sont également liés α-(1,4) et le fucose lié en α-(1, 2) (Hussein et al., 1980). Des études ont montré que les fucoïdanes extraits de *F. vesiculous* présentaient une structure de α-L-Fuc liée par des liaisons de type (1,2) et des groupements sulfate en position C-4 (**Figure 31**). D'autre type de fucoïdanes extraits de *F. vesiculous* ont présenté quant à eux des résidus de α-L-fucose liés par des liaisons de type (1,3), ramifiés et sulfatés non seulement en position C-4 mais aussi en C-2 (Bilan et al., 2006).

Différents ensembles de fucoïdanes peuvent être produits par la même espèce d'algues brunes. Par exemple, l'algue brune *Sargassum stenophyllum* synthétise des fucoïdanes composé d'une chaîne principale de α-L-fucose associée à d'autres monosaccharides tels que du β-D-Gal, β-D-Man, α-D-GlcA, α-D-Glc et β-D-Xyl, avec un faible degré de sulfatation (Duarate et al., 2001). On retrouve également un autre type de fucoïdanes produit par cette même algue, composés de résidus Fuc et Gal, et de plus faibles quantités de GlcA, avec des taux en sulfates plus importants, substituants les unités Fucosyl. De la même manière, l'algue brune *Adenocystis utricularis* produit deux types différents de fucoïdanes : l'un est un galactofucane sulfaté, tandis

que le second est un gluronofucoïdane, composé principalement de résidus fucose associés à d'autres monosaccharides et particulièrement des acides uroniques. Ce polymère est cependant faiblement sulfaté (Ponce et al., 2003). Enfin, Cui et al. (2022) ont extrait six types différents de fucoïdanes de *S. japonica*, dont les structures variaient en fonction de leurs compositions en monosaccharides, teneurs en sulfate et leurs masses molaires.

II.2. Propriétés techno-fonctionnelles des polysaccharides de macroalgues

II.2.1. Généralités sur les phycocolloïdes

Les phycocolloïdes sont les colloïdes extraits à partir d'algues et plus précisément des macroalgues. Ces substances constituent une famille parmi les hydrocolloïdes, sont solubles dans des solutions aqueuses et responsables du changement de leurs mobilités (propriétés rhéologiques et modes d'écoulements). Ces phycocolloïdes sont valorisés en raison de leurs propriétés gélifiante, épaississante et/ou stabilisante. Les alginates, les carraghénanes et les agars sont couramment utilisés dans divers domaines, alimentaire, pharmaceutique ou cosmétique. La diversité structurale des phycocolloïdes implique une variabilité de leurs propriétés rhéologiques et un large spectre d'activités biologiques.

La solubilité de ces polymères dans des solutions aqueuses dépend de plusieurs facteurs, dont notamment le type et le degré de substitution des chaînes, les motifs constitutifs ainsi que les liaisons hydrogènes inter- et intra-moléculaires (Hentati et al., 2020). La viscosité en solution est un autre paramètre qui caractérise les hydrocolloïdes. Elle dépend de facteurs intrinsèques dont la masse molaire, le degré de polymérisation ainsi que la conformation que prend le polymère en solution. D'autres facteurs extrinsèques affectent le comportement rhéologique des hydrocolloïdes en solution, comme le pH, la température ou la teneur en sels, le plus souvent cationiques (Benaoun et al., 2017).

II.2.2. Propriétés physico-chimiques des fucoïdanes

Plusieurs études ont dressé les caractéristiques structurales ainsi que les propriétés physicochimiques des fucoïdanes, comme la réticulation ionique, la solubilité, la non-toxicité, la rhéologie, la biocompatibilité et la biodégradabilité (Alipour et al., 2018). Les fucoïdanes sulfatés sont solubles dans l'eau, ce qui facilite la construction de systèmes de distribution (drug delivery system) basés sur le fucoïdane et d'autres molécules chargées positivement. A titre d'exemple, les groupements sulfatés chargés négativement des fucoïdanes pourraient être combinés avec les groupements ammonium du chitosane pour former des nanoparticules, des

hydrogels et des films comestibles utilisés dans le domaine nutraceutique (Huang et al., 2016 ; Silva et al., 2013).

A la différence des autres PS, les fucoïdanes forment des solutions non visqueuses. Par conséquent, ils ne peuvent pas être utilisés comme épaississant ou agent gélifiant dans l'industrie alimentaire. Les fucoïdanes peuvent avoir de légers comportements de type rhéofluidifiant en mode écoulement et en mode oscillatoire ou un comportement pseudoplastique à faible taux de cisaillement et à faible température, comme pour les fucoïdanes extraits d'*Apostichopus japonicus* (Yu et al., 2015). D'autres, extraits de *Fucales vesiculosus*, manifestaient quant à eux un comportement newtonien, même à haut taux de cisaillement (Hentati et al., 2020). La variation de la viscoélasticité dynamique dépend par ailleurs étroitement de la concentration en fucoïdanes, de la température et de l'ajout de NaCl et CaCl₂, les valeurs atteintes étant généralement négligeables en comparaison avec d'autres hydrocolloïdes viscosants (Rioux et al., 2007).

II.2.3. Propriétés physico-chimiques des alginates

Les alginates peuvent avoir des comportements de type viscoélastique, rhéofluidifiant et newtonien en mode écoulement et en mode oscillatoire. En fait, en fonction de la concentration et des taux de cisaillement, les alginates peuvent présenter deux caractères rhéologiques différents : à faible concentration et à faible taux de cisaillement, le comportement est assimilable à celui d'un liquide de type newtonien, alors qu'à des taux de cisaillement et de concentrations élevés le comportement peut correspondre à un liquide rhéofluidifiant (Hentati et al., 2020). Cette observation est d'autant plus vraie en présence d'ions cationiques, à l'origine de la création d'un réseau tridimensionnel composé de liaisons inter- et intra-chaîne capable de piéger des quantités d'eau plus importantes (modèle eggbox). La capacité de gélification des alginates peut s'observer avec et sans calcium en mode oscillatoire par exemple, la plupart présentant un comportement viscoélastique (Zhang et al., 2021). Ainsi, les alginates ont la capacité de former des gels en présence de plusieurs ions à savoir, le magnésium (Mg), le manganèse (Mn), le calcium (Ca), le cuivre (Cu), le baryum (Ba) et le plomb (Pb). Après enchâssement de ces chaînes, on assiste à la formation de gels sous forme de boîtes d'œufs. La rigidité de ces gels dépend de la nature des blocs formant les alginates (blocs homogènes MM ou GG ou des blocs hétérogènes MG) ainsi que du rapport M/G (Dávila et al., 2017). On distinguera ainsi les alginates de haute viscosité ($M/G > 1$) des alginates de haut pouvoir gélifiant ($M/G < 1$).

II.3. Propriétés biologiques des polysaccharides des macroalgues

II.3.1. Généralités sur le potentiel biologique des poly- et oligo-saccharides de macroalgues

De nombreux PS ont été qualifiés de PS bioactifs dès l'instant qu'ils manifestaient des effets biologiques *in vitro* (modèle) et/ou *in vivo* (**Figure 32**). L'identification des fonctions biologiques de PS bioactifs est intrinsèquement liée à leurs structures : on parle de la relation structure/fonction. On distingue les PS naturels de ceux modifiés, dont les activités biologiques et le spectre peuvent être très larges. A l'heure actuelle, plusieurs PS ont ainsi trouvé diverses applications en tant que composés bioactifs dans les domaines thérapeutique, l'élicitation des plantes, la cicatrisation, l'administration de médicaments ou l'ingénierie tissulaire (Mzibra et al., 2022). C'est particulièrement vrai pour les PS extraits de macroalgues (**Figure 32**). Les alginates extraits des macroalgues sont exploités dans l'industrie agroalimentaire comme agents texturants (McHugh et al., 1987) dans la production des différents produits comme les sauces et les crèmes (Qin et al., 2018). Leur capacité à générer des gels non thermoréversibles favorise leur utilisation comme additif dans les produits reconstitués.

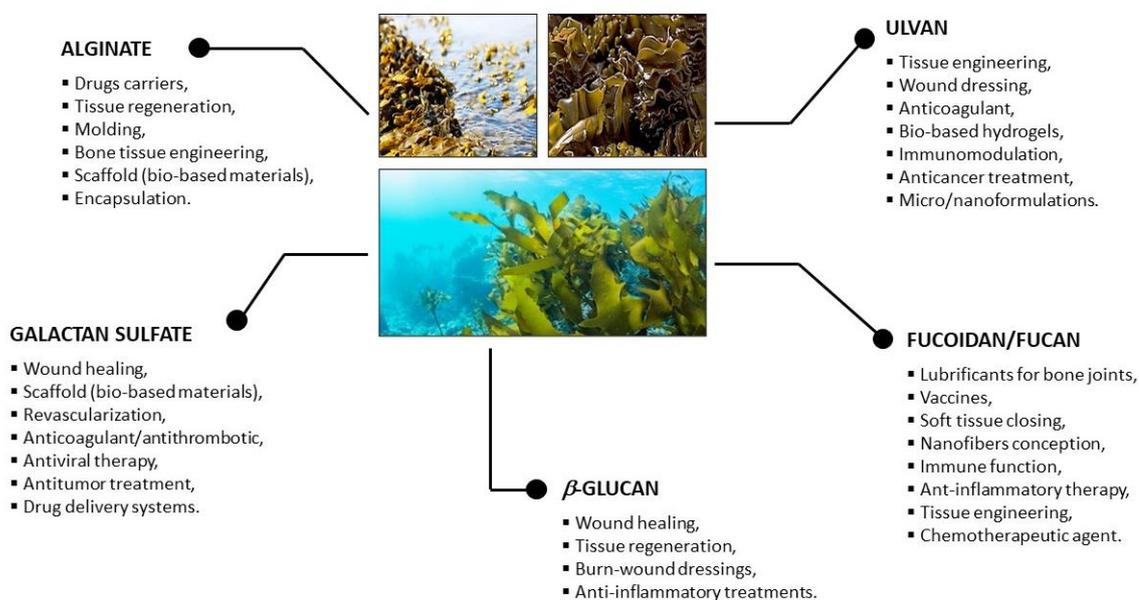


Figure 32. Potentialités techno-fonctionnelles des polysaccharides issus des différences espèces macroalgales.

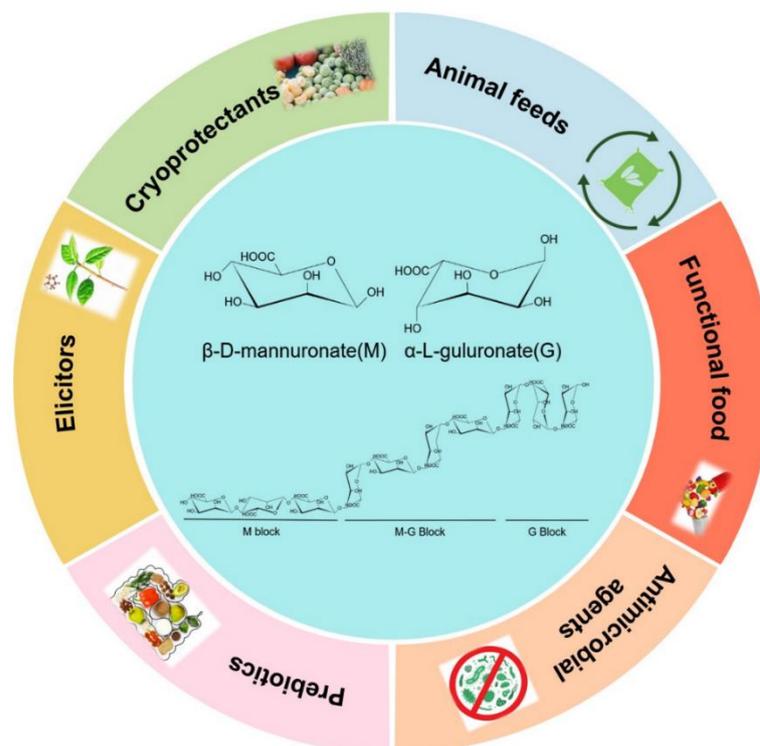


Figure 33. Applications des algines (Li et al., 2021).

Les algines sont utilisées dans les industries papetières pour la fabrication du papier d'emballages biodégradables, voire dans les vêtements jetables. Ils servent aussi d'agent de floculation dans le traitement des eaux usées afin d'accélérer la sédimentation. Les algines sont aussi utilisées comme supports pour l'administration des médicaments, approuvés par la FDA, dans le traitement de maladies neurologiques ou des « thérapies » antimicrobienne et antivirale (Kontominas et al., 2020) (**Figure 33**). On les retrouve dans la composition de médicaments contre les reflux gastro-œsophagien (Leiman et al., 2017). En raison de leur très bonne biocompatibilité et biodégradabilité, les algines sont utilisées pour fabriquer des pâtes à empreintes dentaires, la confection d'inlays, couronnes ou pansements thérapeutiques (Cervino et al., 2018). Ils peuvent être utilisés comme matrice pour les cultures tissulaires tridimensionnelles ou des transplantations cellulaires, comme adjuvants dans la synthèse d'antibiotiques, ou pour leurs activités contre des virus ou dans des pathologies diabétiques ou lipidémiques (**Figure 33**). Des études ont montré que les algines de *Sargassum fusiforme* réduisaient significativement la teneur en cholestérol total, en triglycérides et en cholestérol hypoprotéique de basse densité chez la souris (Liu et al., 2021). Ainsi, un extrait de *Sargassum vulgare* a montré une activité inhibitrice du syncytium contre le virus lymphotrope des lymphocytes T humains (VTLH-1) (Villela et al., 2002). Un extrait brut de *Sargassum polycystum* a présenté par exemple un effet significatif sur la prévention des troubles grassex

graves et sur le métabolisme des enzymes stimulées par l'acétaminophène lors d'une lésion hépatique (Raghavendran et al., 2005). Les alginates présentent également des activités anticoagulantes, ce qui les rend efficaces en biomédecine, même si on peut considérer ces dernières comme minorées par rapport aux activités anticoagulantes des fucoïdanes par exemple (Sari-Chmayssem et al., 2016).

De nombreuses études publiées ont décrit aussi les applications biotechnologiques potentielles d'oligo-alginates (Bland et al., 2004). Il a été prouvé que les oligo-alginates générés par hydrolyse enzymatique augmentent la proportion de lactobacilles et des bifidobactéries chez des rats nourris par des oligo-alginates (Wang et al., 2006). De plus, ces derniers induisent la sécrétion de cytokines à partir des cellules RAW264.7 de la lignée cellulaire des macrophages de souris (Iwamoto et al., 2005). D'autres études ont évoqué l'effet éliciteur des oligo-alginates extraits de *L. digitata*, en provoquant un effet inhibiteur contre des micro-organismes potentiellement nocifs (Kupper et al., 2001). D'un point de vue agronomique, les traitements éliciteurs avec des PS ont pris de l'importance en raison de leur potentiel non seulement pour les pratiques agricoles modernes, mais aussi comme outils alternatifs aux produits agrochimiques, nous permettant de résoudre certains dommages environnementaux (Caicedo-López et al., 2021). Au cours des dernières décennies, les poly- ou oligo-saccharides dérivés des algues ont fait l'objet d'une plus grande attention en raison de leur capacité à activer les signaux des plantes qui améliorent la production de métabolites secondaires et déclenchent des réponses de défense chez les plantes. Compte tenu de leur grande diversité, ces composés ont également été suggérés pour agir comme stimulateurs de croissance des plantes, afin notamment d'intensifier l'absorption des substances ou des nutriments, et réduire ainsi l'utilisation des engrais chimiques (Saber Riseh et al., 2022).

L'induction de résistances chez les plantes par les PS des macroalgues est une méthode efficace de lutte contre les contraintes environnementales. Le principe repose sur l'activation ou l'amélioration de plusieurs mécanismes de défense des plantes comme la régulation positive de l'expression des gènes de défense impliqués dans la réponse d'une large gamme de stress abiotiques et biotiques, l'induction du système antioxydant et la production de métabolites secondaires (Nephali et al., 2020). Les alginates et les oligo-alginates sont les plus décrits comme éliciteurs dans la littérature. En effet, le traitement par pulvérisation d'alginates dans le modèle tomate a induit la production temporaire des espèces réactives de l'oxygène, activé la défense antioxydante et augmenté le niveau d'expression des gènes appartenant aux voies des acides salicylique et jasmonique ainsi que de l'éthylène, inhibant alors la croissance

d'*Alternaria solani* (Dey et al., 2019). Küpper et al. (2002) ont montré que des oligo-gulonates pouvaient provoquer une explosion oxydative dans le sporophyte de *L. digitata*. De plus, il a été démontré que les oligo-alginates de *B. bifurcata* et *Fucus spiralis* stimulent les défenses naturelles du palmier dattier en activant l'activité PAL (Phénylalanine ammonia-lyase) et la production de composés phénoliques (Bouissil et al., 2020) alors que d'autres oligo-alginates sont des promoteurs de croissance, par exemple pour *Amaranthus cruentus* (Mollah et al., 2009). Hu et al. (2004) ont rapporté que les oligo-alginates ayant un Mw de 1,445 kDa présentaient des activités sur la β -amylase et pouvaient favoriser la germination des graines de maïs (Hybrid 108). Dans une autre étude, des oligo-alginates ayant des Mw de 1,25 à 1 900 kDa ont été utilisés pour déterminer leurs effets sur la germination de graines de féverole, la fraction la plus petite présentant les activités les plus élevées. D'après Luan et al. (2012), les oligo-alginates de Mw comprise entre 11 et 16 kDa ont démontré une meilleure activité de germination des feuilles de moutarde (*Brassica juncea* var. *rugosa*) et de la laitue (*Lactuca sativa* l'ololo rossa). En outre, les oligo-alginates peuvent augmenter la capacité des plantes à résister au stress hydrique, à la présence de métaux lourds et de fortes salinités. Il a été démontré que les oligo-alginates avec un DP allant de 2 à 6, augmentent la longueur des semis et des racines, le poids frais et la teneur relative en eau dans le blé (*Triticum aestivum* L.) en conditions de sécheresse (Liu et al., 2013). D'autres oligo-alginates avec différentes Mw ont restauré les paramètres de croissance (diamètre de la tige et poids frais) à des degrés divers chez le concombre (*Cucumis sativus* L.), précédemment inhibé par un stress hydrique (Li et al., 2018). Il a également été observé que les oligo-alginates avec des DP entre 2 et 5 (principalement des di- et tri-saccharides) améliorent la biomasse de la tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) sous des conditions de stress hydrique (Li et al., 2018). En cas de stress, les plantes accélèrent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent interagir avec un certain nombre de cibles moléculaires et de métabolites, entraînant des dommages irréversibles. Les plantes ont développé des systèmes de clairance et de détoxification dépendants ou indépendants des enzymes contre les ROS. Les oligo-alginates peuvent activer ce système de défense antioxydant et protéger les plantes des dommages causés par les ROS. Dans une étude antérieure, les semis de riz produisaient plus de catalase (CAT), de superoxyde dismutase (SOD) et de peroxydase (POD) lorsqu'ils étaient pulvérisés avec des oligo-alginates (13,9 à 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Rajput et al., 2021). Appliqués à une concentration de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, les oligo-alginates peuvent lutter contre le stress hydrique du blé en réduisant la teneur en malondialdéhyde (MDA) et en proline, et en améliorant les activités des enzymes SOD et POD (Liu et al., 2013).

Les oligo-alginates peuvent par ailleurs induire la voie ABA (voie de synthèse de l'acide abscisique) chez les plantes stressées par la sécheresse. Liu et al. (2012) ont montré que des oligo-alginates ayant un DP de 2 à 5 amélioraient les activités de CAT, SOD, POD et PAL. Ces oligo-alginates augmentaient également la teneur en proline libre, ainsi qu'en solides solubles totaux (SST) et en ABA ; tout en réduisant les pertes d'électrolytes et la teneur en MDA dans des tomates traitées avec 0,6 mol/L de PEG-6000 (Liu et al., 2009).

Les PS d'algues, dont les alginates et leurs dérivés hydrolysés, peuvent également stimuler la croissance des plantes ont montré que le trempage des graines d'orge dans des solutions d'oligo-alginates améliorait la croissance des semis. Cette amélioration de la croissance, liée à la masse molaire et au rapport M/G, a été observée par une stimulation de la photosynthèse et une amélioration de l'activité d'adsorption. Le coating d'un bulbe d'*Eucomis autumnalis* par un oligo-alginate de faible masse moléculaire a permis d'augmenter la hauteur de la plante, le nombre de fleurons par inflorescence et la teneur relative en chlorophylles (Salachna et al., 2018).

Les oligo-alginates présentent ainsi des effets polyvalents, probablement à cause de leur structure mimant des motifs moléculaires impliqués dans des phénomènes de reconnaissance (récepteur) d'agents pathogènes et d'activation de système de défense (cascade, enzymes, surexpression, etc.).

Outre les applications thérapeutiques classiques des fucoïdanes, comme agents anti-coagulants, antiviraux, anti-inflammatoires, antitumoraux, d'autres applications ont été récemment rapportées. Les fucoïdanes ont été utilisés comme traitements de la cécité (Klettner et al., 2016). Ils ont également été utilisés comme vecteurs de médicaments anticancéreux et antibiotiques (Vaitkute et al., 2022 ; Weber et al., 2017). En fait, il a été démontré que les préparations de nanoparticules, des liposomes, des microparticules et des formulations semi-solides à base de fucoïdanes améliorent la biodisponibilité et l'efficacité des médicaments (Citkowska et al., 2019). Par ailleurs, les fucoïdanes de *Kjellmaniella crassifolia* sont considérés comme agents antiviraux, capables d'inhiber l'infection par le virus neuraminidase (NA) (Lomartire et al., 2022). Dans le domaine cosmétique, les fucoïdanes trouvent aussi des applications. Les fucoïdanes extraits de *F. vesiculosus* jouent un rôle dans la reconstitution de la peau et ont été produits à l'échelle industrielle et commercialisés (Oliveira et al., 2018).

Les biomatériaux issus des fucoïdanes sont largement recommandés pour le traitement des plaies dermiques et les applications de pansements car ils sont non toxiques et hautement

biocompatibles (Shen et al., 2021). Les films d'hydrogel à base des fucoïdanes conviennent aux applications de pansement car ils peuvent fournir un environnement humide pour la plaie et absorber l'exsudat de la plaie, accélérant ainsi la cicatrisation (Shen et al., 2021). Les hydrogels doivent avoir une action antibactérienne pour prévenir l'infection de la plaie et faciliter la cicatrisation.

Le fucoïdane d'*U. pinnatifida* peut améliorer et moduler la réponse de cicatrisation de la peau en augmentant l'expression des gènes de cicatrisation pour les métalloprotéases matricielles (Park et al., 2017). Il a été également démontré que les hydrogels de fucoïdanes / chitosanes préparés à l'aide de *F. vesiculosus* avaient une grande efficacité dans le traitement des brûlures cutanées avec la meilleure régénération des structures papillaires dermiques et la fermeture la plus rapide des plaies (Sezer et al., 2007).

Les hydrogels à base de fucoïdanes trouvent de nombreuses applications biomédicales dans l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative en tant que matrices de réparation avec des cellules pré-ensemencées et des facteurs de croissance bioactifs. La réparation et la régénération des tissus, par exemple la réparation osseuse, nécessitent la prolifération des cellules, l'établissement d'une communication cellule-cellule et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins ou l'angiogenèse. Une étude a montré le potentiel thérapeutique des fucoïdanes dans la différenciation des ostéoblastes et l'angiogenèse *in vivo* dans le modèle lapin présentant des défauts osseux crâniens, où les fucoïdanes ont accéléré la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et ont favorisé partiellement la formation osseuse (Sezer et al., 2007). Les fucoïdanes de *Sargassum ilicifolium* ont également un potentiel dans l'ingénierie tissulaire osseuse car ils peuvent induire une activité de phosphatase alcaline, une minéralisation osseuse et l'expression de gènes spécifiques des ostéoblastes dans les cellules souches mésenchymateuses (GV et al., 2022).

Les biomatériaux hybrides, constitués de combinaisons de céramiques, d'hydroxyapatite et d'autres polymères, tels que le fucoïdane, le collagène, la chitine et le chitosane, sont utilisés, en partie pour leur caractères plus biocompatibles et biodégradables. De tels biomatériaux hybrides peuvent imiter la matrice extracellulaire et les propriétés mécaniques de l'os et sont considérés comme des fournisseurs de résultats plus prometteurs dans la réparation osseuse que les matériaux individuels (Young et al., 2016). D'après la littérature, des tests de bioactivités de nanocomposites hydroxyapatite/fucoïdane n'ont révélé aucun effet toxique sur des cellules souches d'origine adipeuse. Des nanocomposites d'hydroxyapatite/fucoïdane ont également augmenté, dans le modèle lapin, de manière significative l'expression de marqueurs de

différenciation ostéogénique aux stades précoce et terminal, tels que le collagène de type 1, l'ostéocalcine, l'ostéopontine et ont induit une minéralisation pour la formation osseuse (Young et al., 2016).

En outre, les fucoïdanes peuvent être utilisés dans des systèmes d'administration des médicaments en utilisant des nanoparticules (NPs). Pawar et al. (2019) ont montré le développement d'une plateforme de nanoparticules efficaces, intoxiques et immunocompétentes pour la délivrance ciblée de doxorubicine contre le cancer du sein en assemblant électrostatiquement du fucoïdane avec de la polyéthylèneimine cationique. La cytotoxicité, l'arrêt du cycle cellulaire et l'effet apoptotique sur les cellules tumorales étaient fortement améliorés en utilisant la doxorubicine conjuguée aux NP de fucoïdanes par rapport aux médicaments libres. De plus, la pharmacocinétique de la doxorubicine piégée dans les NP, de fucoïdanes a révélé une localisation préférentielle du médicament dans les tumeurs indiquant son utilisation excellente et sûre comme agent chimiothérapeutique immunomodulateur contre le cancer (Jafari et al., 2020).

Le fucoïdane anionique peut se réticuler physiquement avec des groupements cationiques des autres polymères, tels que le collagène, la gélatine, l'alginate et le chitosane, par le biais d'interactions électrostatiques formant des hydrogels (Lin et al., 2022). Ces hydrogels présentent des propriétés très intéressantes dont une porosité permettant de former des nanogels. Le fucoïdane extrait de *Turbinaria decurrens* et des NPs d'argents recouverts de fucoïdanes ont montré une excellente activité antibactérienne contre des agents pathogènes cliniques, avec une action plus prononcée contre des bactéries à Gram négative (Shanthi et al., 2021). Des hydrogels constitués de poly-méthacrylate de 2-hydroxyéthyle greffé de fucoïdanes présentent de bonnes activités antibactériennes en application ophtalmique (Lee et al., 2012). La présence de groupes fonctionnels acides et basiques rend les fucoïdanes applicables dans les systèmes d'administration de médicaments sensibles au pH. Coutinho et al. (2016) ont ainsi développé des NPs de fucoïdanes/chitosanes mucoadhésifs et sensibles au pH pour l'administration orale de méthotrexate dans le traitement du cancer du poumon.

Dans un autre volet, l'Union européenne a rappelé que seuls les extraits de fucoïdanes de *F. vesiculosus* et *U. pinnatifida* sont autorisés en tant que nouveaux aliments à utiliser dans les aliments et les compléments alimentaires (López-Rodríguez et al., 2022). Cependant, les fucoïdanes sont également présents dans des espèces comestibles, telles que *L. japonica* et *C. okamuranus*. Les fucoïdanes peuvent ainsi impacter, après ingestion, la croissance et « la productivité des animaux », en modulant l'environnement intestinal, facilitant la croissance

d'une microflore bénéfique et stimulant le système immunitaire (Anisha et al., 2022). Pour terminer, les films d'emballage comestibles à base d'ingrédients biosourcés et éventuellement comestibles sont de plus en plus étudiés (Ebrahimzadeh et al., 2023). De ce fait, des films composés de fucoïdanes extraits de la macroalgue brune *Sargassum latifolium*, comestibles et antioxydants, sont développés (Gomaa et al., 2018). L'utilisation des fucoïdanes dans des films alginates/chitosanes a permis d'améliorer leur perméabilité à la vapeur d'eau et à l'oxygène ainsi que leur épaisseur et la teneur en humidité ; assurant des propriétés significatives contre les ultraviolets et des activités antioxydantes (réduction d'ions ferreux et piégeage des radicaux hydroxyles) (Gomaa et al., 2018).

Les laminarines extraits de *Fucus*, *Laminaria*, *A. nodosum* et *U. pinnatifida* ont également montré un effet sur des bactéries pathogènes (Hoffman et al., 1995), avec l'avantage de ne pas favoriser la coagulation sanguine (Shanmugam et al., 2000). Le galactane sulfaté extrait de *Chaetomorpha aerea* a inhibé la croissance de *Staphylococcus aureus* (50 mg/mL d'extrait) mais pas celle de *Salmonella enteritidis* (Pierre et al., 2011).

En stimulant la production et/ou l'expression des IL, les β -(1,3)-glucanes provenant, par exemple, de *C. vulgaris* et des laminarines, induisent des réponses antifongiques et antibactériennes chez le rat (Rice et al., 2005), et une certaine résistance aux infections par *E. coli* (Verma et al., 2012). Par conséquent, ces types de PS promettent d'être de bons agents antimicrobiens.

Les galactanes sulfates peuvent agir comme agents analgésiques mais pas comme anesthésiques. Le galactane sulfaté de *G. cornée* est un autre PS ayant des caractéristiques d'analgésiques, mais à une concentration plus élevée (9 mg/kg) (Coura et al., 2012). Un galactane sulfaté extrait de *C. feldmannii* est un agent antinociceptif puissant (réduction de 80% des contractions), mais il présente également de bonnes propriétés anticoagulantes (Assreuy et al., 2008). Les PSS de *C. cupressoides* (Rodrigues et al., 2012), à la dose de 27 mg/kg/jour, ont réduit de 90% les contorsions induites chez la souris par l'acide acétique, mais ils ont également montré des effets antalgiques uniquement via des mécanismes périphériques (Rodrigues et al., 2012). Il semble que ces PSS agissent en se liant à la surface des leucocytes, entravant leur migration vers le foyer de lésion tissulaire (Ribeiro et al., 2000), démontrant ainsi également des propriétés anti-inflammatoires. Ainsi, tous ces PSS promettent d'être de bons agents antinociceptifs périphériques, avec une attention particulière par rapport au galactane de *Champia feldmannii* en raison de ses propriétés anticoagulantes.

Le κ -carraghénane, le λ -carraghénane et le ι -carraghénane sont trois types de PSS extraits d'algues rouges (Duarte et al., 2001) capables de former des hydrogels (Carlucci et al., 1997). Des fibres microscopiques, des billes, des nanotubes, des sphères, des nanoparticules contenant des carraghénanes ont été développés pour diverses applications biomédicales (Sekine et al., 1995). Certaines des activités biologiques rapportées des carraghénanes comprennent des activités antioxydantes (Takano et al., 1998), antitumorales et immunomodulatrices (Pereira et al., 2005), ainsi que la réduction des taux sériques de cholestérol et de triglycérides (Pujol et al., 1996), la régulation des facteurs de croissance (De Clercq et al., 2000), l'inhibition de la formation de syncytium (Luescher-Mattli et al., 2003), et promouvoir la fonction des cellules HéLa et des fibroblastes pour la cicatrisation des plaies (Prajapati et al., 2014).

Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, les carraghénanes ont été fréquemment utilisés pour fournir des facteurs de croissance (Tsuge et al., 2004), pour immobiliser des enzymes (Campo et al., 2009), pour cicatriser des plaies et pour encapsuler plusieurs types de cellules, par exemple, des cellules dérivées de la graisse humaine, des cellules souches, des chondrocytes nasaux humains ou des cellules chondrocytaires pour les délivrer *in vivo* dans des thérapies cellulaires et la régénération du cartilage (Carlucci et al., 1999). κ et ι -carraghénanes sont des vecteurs potentiels pour la libération contrôlée de médicaments (Caceres et al., 2000). Des hydrogels, des billes et des nanoparticules à base de carraghénanes ont été développés pour délivrer par exemple de l'albumine (Cho et al., 2011), de l'acide rosmarinique (AR) (Mazumder et al., 2002), de l'acyclovir (médicament antiviral) (Kraan et al., 2012), de l'ibuprofène (Nishino et al., 1991), de l'insuline.

L'ulvane est un PSS extrait de macroalgues vertes avec des structures plus diverses et complexes, ainsi que des activités biologiques moins étudiées par rapport à d'autres PSS (Recalde et al., 2009). Jusqu'à présent, les diverses formes de support utilisant les ulvanes, incluant des nanofibres, des membranes, des particules, des hydrogels et des structures poreuses 3D, ont été développées pour l'administration de médicaments (Toyama et al., 2010), pour la cicatrisation et l'ingénierie de tissus osseux (Rodrigues et al., 2013), pour inhiber des croissances cellulaires spécifiques (HeLa, glioblastome) (Ciancia et al., 2007), pour la prolifération des splénocytes (Farias et al., 2008), pour améliorer la croissance des fibroblastes et l'angiogenèse (Na et al., 2010), pour améliorer la différenciation des cellules PC-12 ou encore pour la prolifération des cellules souches mésenchymateuses (Lee et al., 1999).

II.3.2. Activités biologiques des fucoïdanes

II.3.2.1. Propriétés anticoagulantes et antithrombotiques

La première activité décrite pour les fucoïdanes est l'activité antithrombotique. L'une des approches de traitement de la coagulation intravasculaire et des maladies thromboemboliques est l'utilisation des anticoagulants telle que l'héparine qui est l'un des anticoagulants les plus utilisés en raison de ses propriétés poly-anioniques. Les fucoïdanes inhibent la cascade de coagulation endogène ainsi que l'activité de la thrombine et/ou la polymérisation de la fibrine, mais ses dérivés affectent la cascade de coagulation extrinsèque (**Figure 34**). L'activité anticoagulante élevée des fucoïdanes est principalement attribuée à la formation de complexes antithrombine III-Xa et la liaison directe à la thrombine (Ustyuzhanina et al., 2013). Des études ont montré que les dérivés des fucoïdanes, notamment sulfatés, phosphorylés et aminés, peut prolonger le temps de thromboplastine et le temps de thrombine (Ustyuzhanina et al., 2013).

Plusieurs études ont montré que l'activité anticoagulante des fucoïdanes dépend fortement de leurs masses molaires, de leur degré de sulfatation, du rapport sulfates/sucres totaux et de leurs ramifications glycosidiques (Nishino et al., 1991). A titre d'exemple, Jin et al. (2013) ont montré que la masse molaire des fucoïdanes et leur contenu en galactose affectent leur activité anticoagulante de manière dose-dépendante. D'autres études ont prouvé que les fucoïdanes à haute teneur en sulfates (en positions *O*-2 et *O*-3 du résidu fucopyranose) et à faible teneur en acides uroniques présentent une activité anticoagulante élevée (Athukorala et al., 2006 ; Shanmugam et al., 2000). Des études antérieures ont confirmé que l'activité antithrombotique des fucoïdanes extraits de l'algue d'*Eckloniakurome* est corrélée à l'augmentation de leur masse molaire (de 10 à 50 kDa) (Nishino et al., 1991).

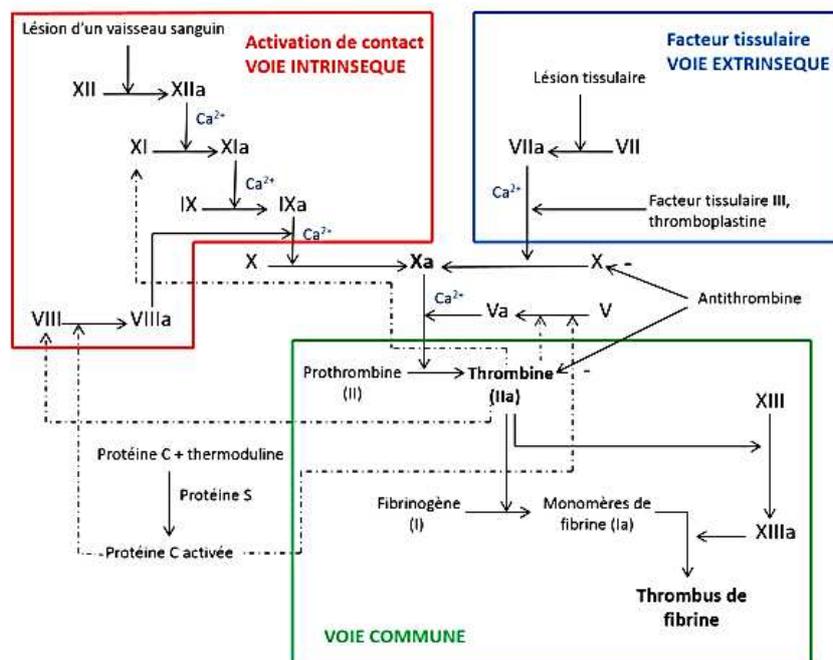


Figure 34. Mécanisme de coagulation basée sur l'activation de deux voie. La voie intrinsèque et la voie extrinsèque se rejoignent en une voie commune aboutissant à la formation du complexe de fibrine (Winther-Larsen et al, 2022).

II.3.2.2. Propriétés antioxydantes

ROS comprennent l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singlet et l'oxyde nitrique (NO) (**Figure 35**). En général, les faibles teneurs en ROS régulent de nombreux processus biochimiques essentiels pour la division cellulaire alors que des teneurs élevés en ROS endommagent l'homéostasie du statut redox, perturbant ainsi les lipides, les protéines, les acides nucléiques et contribuent à l'apparition de maladies dont le cancer, l'athérosclérose, le diabète, les maladies neurodégénératives, les maladies inflammatoires et les maladies liées au vieillissement. Ainsi, l'identification des composés antioxydants naturels et non toxiques est en vogue. Il a été rapporté que les fucoïdanes extraits de macroalgues brunes présentent généralement une forte activité antioxydante, comparable aux antioxydants synthétiques tels que le butyl hydroxyl anisole (BHA), le butyl hydroxy toluène (BHT) et le tert-butyl hydroxyquinone (TBHQ) (Elboutachfai et al., 2011). L'activité antioxydante de ces polymères dépend de leurs masses molaires et teneurs en sulfate. Ainsi, les fucoïdanes de faible masses molaires possédant une teneur élevée en groupements sulfate sont capables de réaliser l'oxydation des lipoprotéines (Berdahl et al., 2010). Les fucoïdane extraits de *L. japonica* ont été utilisés pour traiter les maladies secondaires causées par les dommages

radicalaires en raison de leurs propriétés antioxydantes (Wang et al., 2010). Les fucoïdanes sont largement utilisés comme des antioxydants naturels dans les produits de soins de la peau. A titre d'exemple, des fucoïdanes sulfatés de l'algue brune *Sargassum fulvellum* sont des piègeurs de NO plus puissants que les antioxydants commerciaux comme l' α -tocophérol et le BHA (Hentati et al., 2020). L'activité antioxydante des fucoïdanes dépend de la disponibilité d'un certain nombre de groupements fonctionnels, essentiellement les groupements sulfates en position ortho (Wang et al., 2016). En outre, ces substituants jouent un rôle majeur dans l'activité antioxydante et constituent des groupes attracteurs d'électrons, servant d'activateur des atomes d'hydrogène présents sur les groupements carbonés (Ammar et al., 2016). D'autres études illustrent l'effet préventif des fucoïdanes contre la maladie de Parkinson et les dommages rénaux (Luo et al., 2009). Les fucoïdanes sont considérés comme de puissants antioxydants naturels qui pourraient prévenir les maladies associées aux radicaux libres. Ils peuvent protéger contre la peroxydation des lipides en inhibant la formation de radicaux hydroxyle et superoxyde. Wang et al. (2008) ont mis en évidence le rôle des fucoïdanes dans l'inhibition de la peroxydation lipidique à sa teneur en sulfate et à son poids moléculaire alors que De Melo et al. (2022) ont montré que la capacité de réduction d'un fucoïdane extrait de macroalgue était lié non seulement à leurs groupements hydroxyles mais à d'autres fonctions (carboxyles).

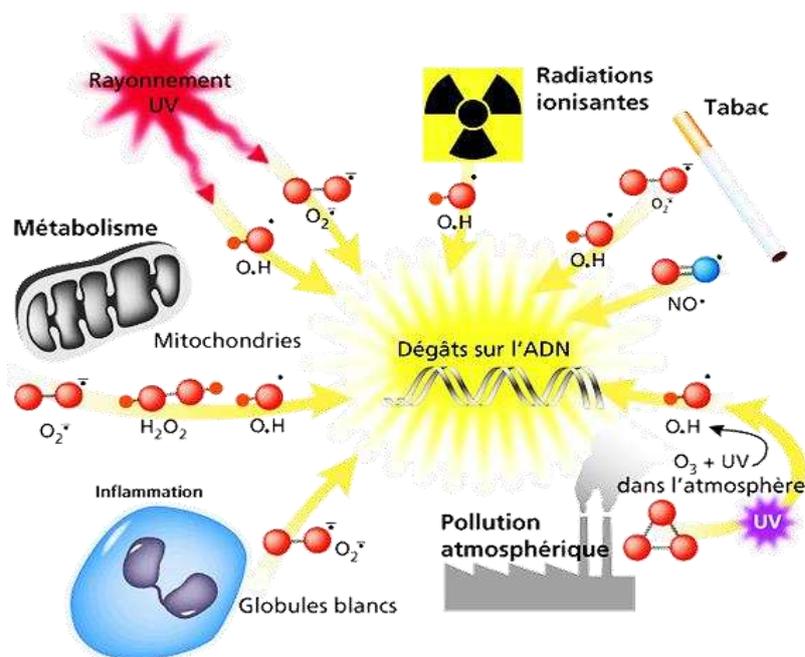


Figure 35. Pouvoir antioxydant des polysaccharides et principales causes de la formation des radicaux libres [18].

II.3.2.3. Propriétés antivirales

Plusieurs études montrent que les fucoïdanes inhibent principalement l'attachement du virus aux cellules hôtes en se fixant sur les glycoprotéines virales externes lors de l'attachement aux cellules cibles (Pradhan et al., 2022) (**Figure 36**). D'autres travaux rapportent qu'après administration de fucoïdanes, on assiste à une augmentation de la réponse du système immunitaire (Apostolova et al., 2020). Il a été montré que des fucoïdanes de faibles masses molaires extraits de *L. japonica* présentent des activités antivirales *in vitro* et *in vivo* contre des Adenovirus et le Parainfluenza virus (Sun et al., 2018).

D'autres études ont révélé que les PS jouent un rôle dans l'inhibition du processus de transcription et de réplication des génomes viraux dans les cellules hôtes. A titre d'exemple, les fucoïdanes isolés de *F. vesiculosus* présentent un effet inhibiteur sur la transcriptase inverse du VIH (virus de sida) (Claus-Desbonnet et al., 2022).

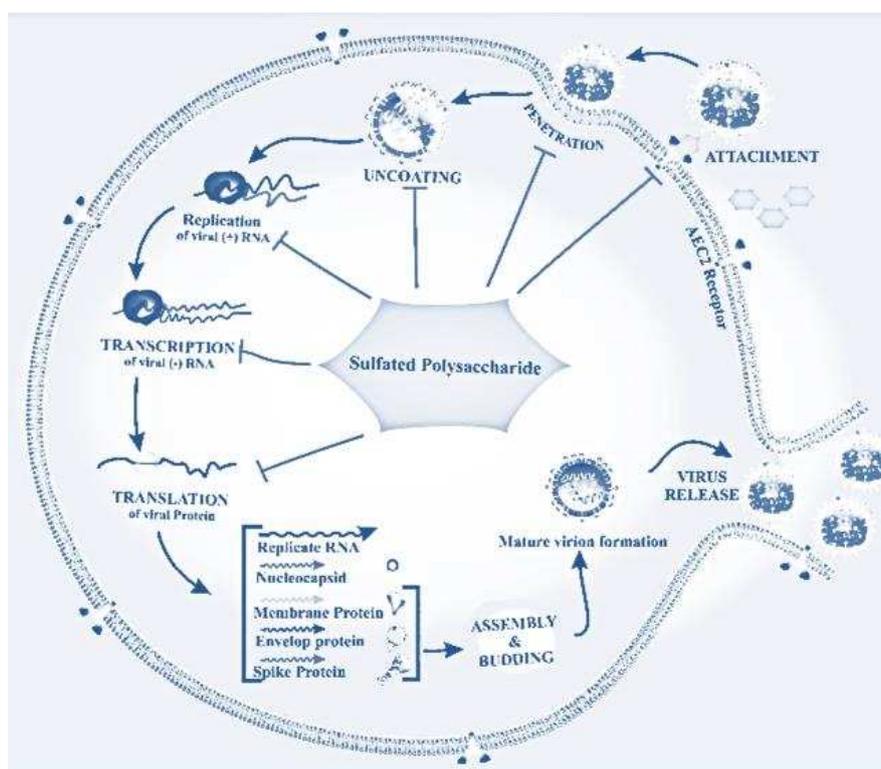


Figure 36. Activités antivirales des fucoïdanes (Pradhan et al., 2022). Les principales étapes du cycle viral se résument en l'attachement du virus, la pénétration et la décapsidation du génome viral, l'expression et la réplication des gènes qui assurent la synthèse des protéines codées par le génome viral et qui permettent sa réplication, l'assemblage des particules virales et la libération de virus.

Les fucoïdanes présentent des structures moléculaires exceptionnelles et exercent des propriétés antivirales potentielles en inhibant plusieurs phases du cycle de vie viral en désactivant directement les virions avant le début de la contamination ou en empêchant sa

reproduction à l'intérieur de la cellule hôte. L'interface ionique entre les glycoprotéines extérieures chargées positivement sur la surface virale encapsulée et les composants chargés négativement de la surface de la cellule hôte provoque un contact précoce pendant la fixation virale. La présence de résidus sulfate favorise l'interaction avec les zones chargées positivement de la glycoprotéine virale, provoquant une densité plus élevée de charge négative à la surface cellulaire et perturbant la première interaction virus-cellule (Sepúlveda-Crespo et al., 2017). Les fucoïdanes peuvent empêcher l'entrée du virus dans la cellule hôte en limitant directement la liaison du virus à la surface cellulaire. Ainsi, ils interagissent avec les récepteurs du virus, empêchant l'infection virale, en bloquant le contact avec la surface de la cellule hôte ou en interagissant directement avec les virions. Plusieurs travaux ont révélé que les charges négatives des groupes sulfates des fucoïdanes interagissent avec le virus en masquant la charge positive sur les récepteurs viraux (Wang et al., 2012) Les fucoïdanes interagissent également par interaction avec les protéines membranaires virales. Ils peuvent se lier aux groupes glucidiques sur les chaînes polypeptidiques du virus pour l'empêcher de pénétrer dans les cellules hôtes. Les fucoïdanes se fixent aussi à la capsid virale, empêchant ainsi la pénétration du virus à l'intérieur de la cellule hôte. Les fucoïdanes peuvent enfin entraver la transcription et la réplication du virus une fois qu'ils atteignent la cellule hôte en interférant avec les enzymes de réplication comme la transcriptase inverse ou en bloquant la synthèse des protéines de ARNm (ARN messenger) (Queiroz et al., 2008).

II.3.2.4. Propriétés antitumorales

Les fucoïdanes sont considérés comme de nouveaux composés antitumoraux à faible toxicité (**Figure 37**). Il a été montré que les fucoïdanes présentent une activité antitumorale importante contre le cancer du foie, de l'estomac, du col de l'utérus, des poumons et du sein (Wang et al., 2019). Les mécanismes antitumoraux sont médiés par la capacité de ces PS à induire l'apoptose dans les cellules tumorales et d'inhiber l'angiogenèse. L'administration de ces biomolécules permet de contourner les effets toxiques de la chimiothérapie et d'améliorer la fonction immunitaire (Cao et al., 2021).

L'activité antitumorale des fucoïdanes dépend d'une combinaison de facteurs tels que la structure chimique, la teneur en groupes sulfates, la masse molaire, le rapport et la composition en monosaccharides et le type des liaisons osidiques (Zayed et al., 2020).

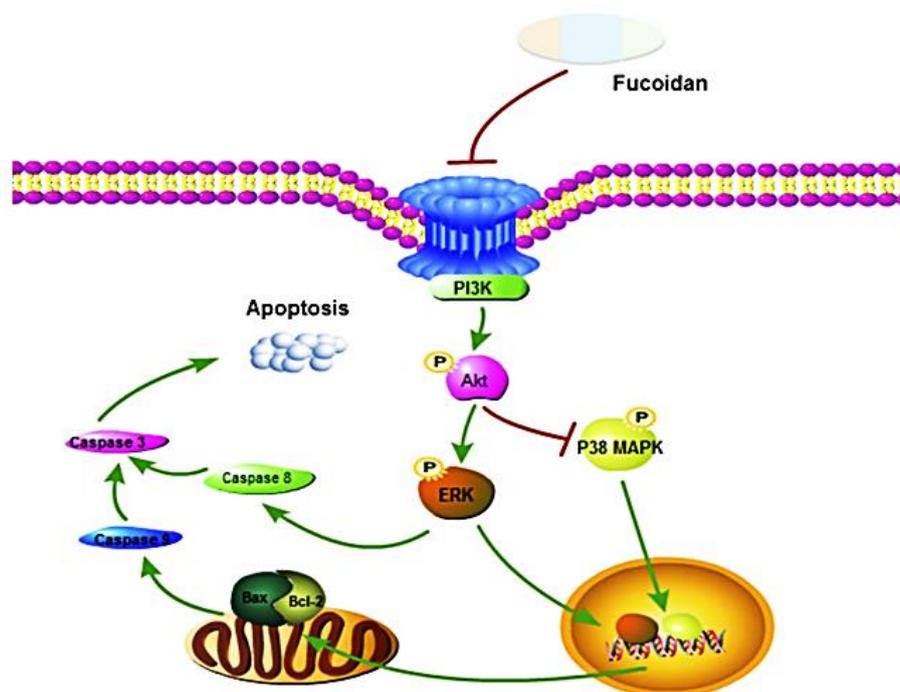


Figure 37. Activité antitumorale des fucoïdanes (Lin et al., 2020). Le fucoïdane induit l'apoptose et inhibe la prolifération cellulaire *via* les voies de signalisation p38 MAPK/ERK et PI3K/Akt.

II.3.2.5. Propriétés immunomodulatrices

Les fucoïdanes sont considérés comme des immunomodulateurs naturels (**Figure 38**). Ils peuvent se lier à différents récepteurs cellulaires tels que les récepteurs de type Toll (TLR) présents sur les cellules dendritiques (CD) au niveau des macrophages et d'autres monocytes, et les activer pour libérer des facteurs pro-inflammatoires : les cytokines et les chimiokines (Hayashi et al., 2008).

Les fucoïdanes peuvent être utilisés comme adjuvant en induisant la régulation de l'expression de CD40, CD80 et CD86 et la production d'interleukine-6, IL-12 et de facteurs de nécrose tumorale- α (TNF- α) qui peuvent avoir un effet bénéfique dans le développement d'un vaccin contre les tumeurs (**Figure 38**) (Apostolova et al., 2020).

Plusieurs études ont montré que les fucoïdanes extraits de *F. vesiculosus* favorisent la production de TNF- α et de l'IL-6 au niveau des macrophages (Choi et al., 2005). De plus, ils améliorent l'équilibre immunitaire Th1/Th2 suite à l'activation des cellules NK et régulent la protéine kinase activée par le mitogène P38 ainsi que le facteur nucléaire kappa B de NF- κ B favorisant *in fine* la libération de NO des macrophages (Jayawarden et al., 2022).

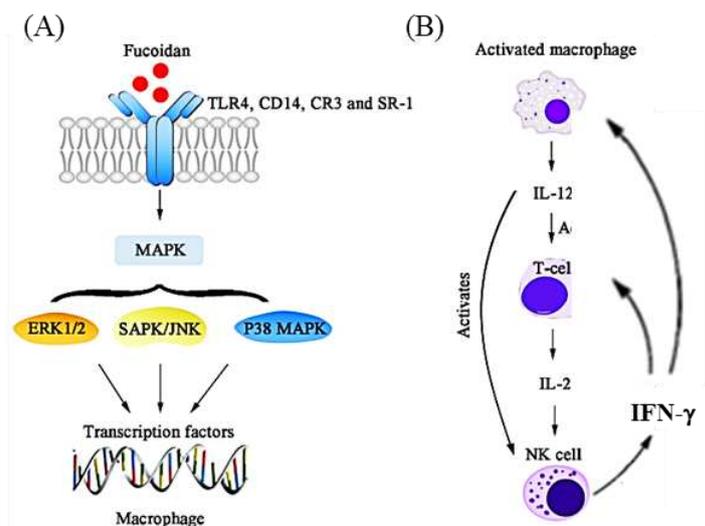


Figure 38. Activité immunomodulatrice des fucoïdanes et mécanisme d'action du fucoïdane sur l'activation des macrophages et des cellules NK. (A) Le fucoïdane se lie à des récepteurs glycoprotéiques spécifiques au niveau des membranes cellulaires des macrophages et active les MAPK, induisant ainsi l'activation des facteurs de transcription. (B) La libération de des cytokines à partir des macrophages activés telles que l'IL-12, qui peuvent activer les cellules N' et qui peuvent stimuler davantage l'activation des lymphocytes T *via* l'IFN- γ (Duan et al., 2020).

II.3.2.6. Effets stimulateurs des défenses naturelles des plantes

Les fucoïdanes et leurs dérivés oligosaccharidiques sont utilisés comme des biostimulateurs des mécanismes de défense chez les plantes. C'est une approche biologique pour lutter contre les phytopathogènes (**Figure 39**). Des études récentes ont montré que les propriétés biologiques et biostimulatrices des fucoïdanes dépendent de leurs propriétés structurales notamment le degré de sulfatation. Bouissil et al. (2020) ont mis en évidence que les fucoïdanes de *B. bifurcata* et *F. spiralis* présentent des effets stimulateurs des défenses du palmier dattier grâce à l'activation de PAL et l'augmentation de la teneur en phénols et en lignine dans les racines.

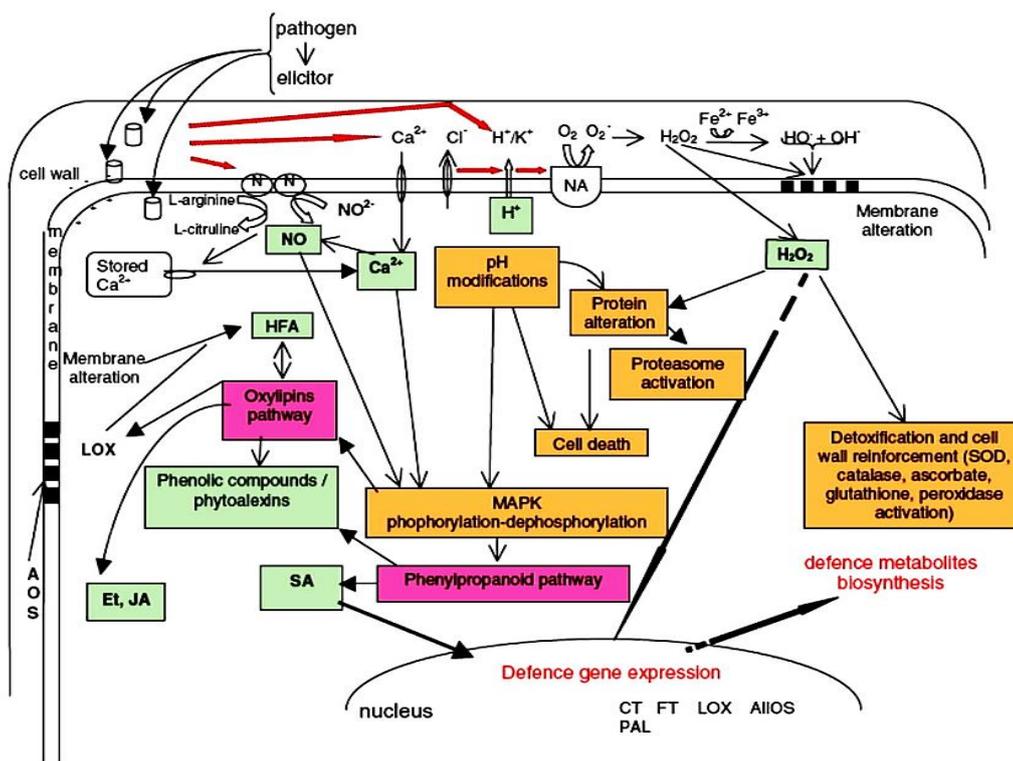


Figure 39. Mécanisme de défense chez les plantes (Desender et al., 2007). Schéma représentatif des réactions de défense induites suite aux interactions plante/pathogène ou plante/éliciteur. La reconnaissance d'éliciteurs par les cellules végétales déclenche la production de molécules de signalisation (boîtes vertes), qui activent des voies biochimiques spécifiques à la défense (boîtes roses) ou affectent directement le métabolisme cellulaire (boîtes brunes), NO, oxyde nitrique ; HFA, acide gras hydroxylé ; SA, acide salicylique ; CT, coumaroyl tyramine ; FT, féruloyl tyramine ; LOX, lipoxygénase ; AllOS, allène oxyde synthase ; Et, éthylène ; P, perception.

II.3.2.7. Autres activités

Outre les effets biologiques déjà cités, de nouvelles activités ont été récemment mises en lumière pour les fucoïdanes. On peut noter leur capacité à améliorer la fonction hématopoïétique permettant de les utiliser comme traitement dans le cas de complications immunosuppressives (Anisimova et al., 2017). Ils sont étudiés également pour les propriétés

neuroprotectrices ou comme agents hypoglycémiants afin de lutter potentiellement contre la maladie de l'Alzheimer ou le diabète, respectivement (Subaraja et al., 2020) (**Figure 40**).



Figure 40. Activités des fucoïdanes des macroalgues brunes (source personnelle).

II.3.3. Activités biologiques des alginates

Du fait de la diversité de leurs activités biologiques, les alginates sont utilisés dans un large éventail d'applications industrielles. En effet, ces biopolymères présentent des propriétés immunomodulatrices, antimicrobiennes, antioxydantes, probiotiques, antihypertensives, antidiabétiques, antitumorales, anticoagulantes, protectrices contre les rayonnements solaires, antibactériennes, hypolipidiques, antihypertensives et hyperglycémiques ainsi que la capacité d'éviter l'obésité et d'améliorer les propriétés de prolifération cellulaires. Ils régulent également la croissance des plantes. A titre d'exemple, ils ont été utilisés comme (i) prébiotiques, (ii) compléments alimentaires pour l'aquaculture, l'élevage des volailles et des porcs, (iii) stimulateurs de la croissance végétale et microbienne et (iv) cryoprotecteurs pour les aliments surgelés (Chouana et al., 2017). La dépolymérisation des alginates aboutit à la formation d'oligo-alginates de différentes masses molaires, de différents rapports M/G et de différentes organisations des homo et hétéro-blocs. Plusieurs études ont montré que les oligo-alginates constitués de blocs M et de blocs MG possèdent la capacité de stimuler les monocytes pour produire le facteur (TNF)- α , interleukine (IL)-1 et IL-6, alors que les alginates composés seulement par des blocs G n'induisent pas la production de ces cytokines (Xing et al., 2020). Les oligo-alginates peuvent avoir d'autres activités biologiques telles que l'inhibition de la prolifération de fibroblastes et la synthèse de collagène dans la peau, la croissance de kératinocytes humains, la stimulation de la croissance ou encore la migration de cellules endothéliales (Kawada et al., 1997).

Les alginates semblent également avoir des effets biologiques sur les plantes et contribuant essentiel dans la réduction de l'utilisation de pesticides chimiques ou de fongicides (voir Section I.7.7). Plusieurs études ont montré la capacité des alginates extraits de macroalgues brunes à induire une résistance aux plantes contre des agents pathogènes. Il a été démontré qu'un alginat induisait une résistance contre *A. solani* chez des plants de tomates (Saber Riseh et al., 2022). Des alginates et oligo-alginates issus de *Bifurcaria bifurcate* peuvent améliorer significativement les défenses naturelles des plantes contre des pathogènes, en activant la PAL et en stimulant l'accumulation des composés phénoliques dans les feuilles, chez la tomate (Aitouguinane et al., 2020).

II.3.3.1. Activités antioxydantes des alginates

Les alginates ont des propriétés antioxydantes et peuvent être utilisés pour prévenir des dommages oxydatifs. Les propriétés structurales telles que le poids moléculaire, la composition en monosaccharides et la ramification glycosidique affectent leurs activités antioxydantes. La masse molaire et le rapport M/G des alginates jouent un rôle important dans leur capacité à inhiber les radicaux libres. On a ainsi émis l'hypothèse que les PS de faible poids moléculaire avaient plus de groupes hydroxyle réducteurs (en masse) pour accepter et piéger les radicaux libres (Abka-Khajouei et al., 2022). D'autre part, la proportion plus élevée de monomères G augmente l'activité antioxydante par la présence d'une liaison diaxiale dans ces blocs, entravant la rotation autour de la liaison glycosidique. La flexibilité des blocs G affecte ainsi la disponibilité des groupes hydroxyle dans l'alginat de sodium et la capacité à générer des interactions faibles (H). Les alginates ont également la capacité d'inhiber la peroxydation lipidique des liposomes de phosphatidylcholine et de linoléate de protéger les neurones NT2 de la neurotoxicité induite par H_2O_2 et d'inhiber les réactions en chaîne des radicaux libres (Khajouei et al., 2018). Une étude sur un alginat de sodium (M/G = 0,59) de l'algue tunisienne *Gongolaria barbata* (anciennement *Cystoseira barbata*) a montré des propriétés antioxydantes modérées et une forte activité protectrice contre la dénaturation de l'ADN (Abka-Khajouei et al., 2022). Des études ont montré que les alginates peuvent prévenir l'oxydation lipidique dans la formulation de lotions de soins de la peau et qu'ils jouent le rôle d'un piègeur des radicaux hydroxyle et des radicaux superoxyde d'anion. Notons que les alginates sont aussi utilisés comme un nouveau type d'additif alimentaire pour le bétail et la volaille (Ming et al., 2021).

II.3.3.2. Activités antidiabétiques des alginates

L'obésité est devenue une pandémie affectant un tiers de la population mondiale, ce qui entraîne un risque élevé de diabète de type 2 pour les personnes obèses (Kleinert et al., 2016). Actuellement, peu de médicaments efficaces anti-obésité existent sur le marché. Une tendance émergente consiste à utiliser des ingrédients naturels provenant des aliments pour lutter contre l'obésité. L'alginate a été développé comme complément alimentaire de restriction énergétique, pouvant améliorer la perte de poids chez les sujets obèses. Cela a été démontré dans un projet d'intervention diététique de 12 semaines (Georg Jensen et al., 2012). Ils peuvent ainsi former des gels acides et ioniques dans l'estomac, entraînant une diminution de l'activité des enzymes digestives dont la lipase pancréatique (Houghton et al., 2015). De même, Guo et al. (2020) ont rapporté que des alginates de sodium contenant du carbonate de calcium pouvaient former un gel dans l'estomac, réduisant le taux d'hydrolyse de la dextrine. Ils ont également mis en évidence qu'une alimentation enrichie en alginate de sodium pouvait réduire l'apport alimentaire, le poids corporel, la digestibilité apparente des protéines et la glycémie chez les rats, à long terme (Guo et al., 2020). Cependant, une autre étude a rapporté qu'une consommation soutenue d'alginate sur une courte période (10 jours) n'avait aucun effet sur les fonctions gastriques, l'appétit ou l'incorporation intestinale, ce qui soulève des doutes quant à l'efficacité d'un traitement à court terme avec des alginates. Dans un régime riche en graisses avec des souris souffrant de diabète de type 2 induit par injection de streptozotocine (STZ), l'alginate de *S. fusiforme* peut réduire efficacement la glycémie, et les taux des triglycérides et du cholestérol total dans le sang tout en augmentant le HDL-c ainsi que la tolérance au glucose (Liu et al., 2021). De plus, l'administration d'alginates à des souris diabétiques semble avoir un effet modéré sur les modifications pathologiques des tissus adipeux hépatiques, musculaires squelettiques et cardiaques. Il peut d'ailleurs diminuer le stress oxydatif (Liu et al., 2021).

II.3.3.3. Régulation du microbiote intestinal

Les alginates et les oligo-alginates interagissent avec le microbiote intestinal et peuvent ainsi affecter un certain nombre de pathologies ou dérèglements associés à ce dernier. Généralement, les alginates ne sont pas digérés dans le tube digestif supérieur. Lorsqu'ils atteignent le côlon, ils peuvent être utilisés par les microbes intestinaux, qui le métabolisent en acides gras à chaînes courtes (AGCC), favorisant ainsi la croissance de bactéries bénéfiques et inhibant la croissance de bactéries nocives (You et al., 2020). Dans des pathologies d'obésité

et/ou de diabète de type 2, les acides gras à courtes chaînes du côlon peuvent maintenir la santé de l'hôte et prévenir certaines maladies du côlon (Campos-Perez et al., 2021). L'ingestion par voie orale d'alginate peut par exemple restaurer le trouble du microbiote intestinal induit par l'ovalbumine dans un modèle murin présentant une allergie contre les œufs (Yao et al., 2021). L'alginate de *S. fusiforme* peut augmenter de manière significative la fréquence des bactéries bénignes, notamment *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Akkermansia*, *Alloprevotella*, *Weissella* et *Enterorhabdus*, et réduire considérablement celle des bactéries délétères telles que *Turicibacter* et *Helicobacter* dans un modèle de souris diabétique de type 2. Les alginate peuvent réduire de manière significative les acides aminés à chaîne ramifiée et les acides aminés aromatiques dans le côlon des souris diabétiques de type 2, indiquant un avantage positif dans le traitement du diabète de type 2 (Liu et al., 2021). Huang et al. (2021) ont rapporté que l'alginate extrait de *Laminaria* augmentait l'abondance des bactéries bénéfiques mais diminuait les bactéries pathogènes dans l'intestin de souris BALB/c immunodéprimées induites par le cyclophosphamide. De plus, un traitement par l'ingestion d'alginate peut inverser les lésions de la muqueuse intestinale et augmenter la perméabilité intestinale en régulant à la hausse l'expression des protéines de la jonction serrée, démontrant la capacité des alginate à renforcer l'immunité (Huang et al., 2021). Ejima et al. (2021) ont montré que des régimes enrichis en alginate pouvaient supprimer le syndrome métabolique (MetS) *via* un effet sur le microbiote intestinal, notamment en modifiant la composition du microbiote intestinal et en augmentant l'abondance de bactéroïdes. L'alginate de *L. japonica* pourrait également augmenter l'abondance de bactéroïdes après fermentation avec des échantillons fécaux frais de volontaires sains (Ai et al., 2019). Al-Najjar et al. (2021) ont constaté que lorsque des rats Wistar étaient nourris avec un aérogel d'alginate réticulé au calcium pendant 14 jours à une dose de 250 mg / jour, les groupes Clostridia et Bacteroides augmentaient et continuaient d'augmenter après l'arrêt de la supplémentation. D'autres groupes de bactéries intestinales, y compris *Erysipelotrichia* et *Candidatus saccharibacteria*, ont augmenté pendant l'administration de l'aérogel, puis ont diminué un mois après (Al-Najjar et al., 2021).

II.3.3.4. Activités immunomodulatrices et antitumorales des alginate

Les récepteurs à la surface des cellules immunitaires innées sont importants pour reconnaître les agents pathogènes et initier des réponses immunitaires. Ils jouent un rôle essentiel dans la régulation et l'activation du complément et de la phagocytose, l'initiation des voies de signalisation pro-inflammatoires et l'induction de l'apoptose (Gordon et al., 2002). Kurachi et al. (2005) ont comparé les capacités des polymères d'alginate avec différents ratios

de Mw et M/G sur la production de facteur de nécrose tumorale (TNF)- α dans les cellules RAW264.7, confirmant que le traitement avec des alginates pouvait induire la libération de TNF- α (Kurachi et al., 2005). Yang et al. (2009) ont mis en évidence qu'un alginate pouvait provoquer des réponses immunitaires innées dans les cellules de type macrophage (cellules RAW264.7), induisant la production de cytokines, telles que l'interleukine (IL)-1 β , IL-6, IL-12 et TNF- α avec le temps et de manière dose dépendante, par l'activation de la voie de signalisation du facteur nucléaire kappa-light-chain-enhancer des lymphocytes B activés (NF- κ B) (Yang et al., 2009). Une étude plus approfondie a montré que les alginates peuvent non seulement activer la voie de signalisation NF- κ B, mais également la voie de signalisation de la protéine kinase activée par le mitogène p38 (MAPK) par l'activation du récepteur de type Toll 4 (TLR4) dans des cellules RAW264.7. Les alginates peuvent également atténuer la réponse anaphylactique systémique chez les rats Wistar induits par le composé 48/80 *via* la suppression de l'activation de NF- κ B (Jeong et al., 2006). Une solution aqueuse d'alginates (Mw = 108 kDa) présentant des caractéristiques d'écoulement non newtoniens, a montré une forte capacité dans le tractus gastro-intestinal à entrer en contact et à absorber l'ovalbumine, probablement par la formation d'un réseau tridimensionnel jouant un rôle de captation de cet allergène. Ainsi, dans des modèles d'allergie induits par l'ovalbumine chez la souris, les solutions aqueuses d'alginate par voie orale peuvent contribuer à l'apparition de réactions allergiques, diminuer les taux d'histamine IgE et d'IL-4 dans le sérum, augmenter le taux d'IFN- γ dans le sérum, augmenter le nombre des lymphocytes T régulateurs dans les tissus de la rate et inhibent la différenciation des cellules T auxiliaires de type 0 (Th0) en cellules Th2 (Yu et al., 2020). D'autres recherches ont montré que la consommation d'alginates par voie orale pouvait restaurer le trouble du microbiote intestinal induit par l'ovalbumine, en récupérant la richesse et la diversité des genres *Alloprevotella*, *Bacteroides*, *Parabacteroides* et *Rikenellaceae* au niveau du microbiote intestinal (Yao et al., 2021). Enfin, notons que les alginates ont montré des activités antitumorales contre diverses tumeurs murines, telles que les tumeurs du sarcome 180 et du carcinome ascitique d'Ehrlich. Les auteurs ont constaté que la teneur plus élevée en bloc M dans l'alginate pouvait être corrélée à une activité antitumorale plus élevée (Fujihara et al., 1992) et que l'activité antitumorale de l'alginate testée pouvait être améliorée en ajoutant du Ca²⁺ (Fujihara et al., 1993).

III. Pigments

III.1. Généralités sur les pigments

Au cours des dernières années, l'intérêt pour les pigments naturels a augmenté de façon exponentielle non seulement en raison de leur potentiel pharmaceutique et biomédical, mais aussi parce qu'ils peuvent être utilisés comme substituts de teintures/colorants artificiels. Il existe une demande croissante pour ces colorants naturels, qui sont utilisés dans les aliments, les produits pharmaceutiques, cosmétiques, textiles et colorants d'impression (Sandybayeva et al., 2022). Les pigments des algues sont classés en chlorophylles, caroténoïdes et phycobilliprotéines. Les cyanobactéries produisent la phycocyanine.

III.2. Classification des pigments

III.2.1. Les Chlorophylles

Les chlorophylles sont des pigments verdâtres non polaires, formé par un anneau de porphyrine ou une hydroporphyrine qui est un chromophore cyclique à quatre noyaux pyrroles liés au niveau du centre par un atome de magnésium. Ces chlorophylles sont présentes chez toutes les algues autotrophes, car ils sont indispensables au processus photosynthétique. On distingue quatre types de chlorophylles. Outre la chlorophylle *a*, qui est le pigment majeur et le plus important pour la photosynthèse, ainsi que les chlorophylles *b*, *c* et *d* (**Figures 41**). La différence entre les chlorophylles *a* et *b* se manifeste par la présence des groupements méthyles au niveau de l'anneau de chlorophylle *a* tandis que la présence de groupes formyle au niveau de chlorophylle *b*. Les macroalgues rouges sont caractérisés par la présence de la chlorophylle *a*. Les algues vertes possèdent des chlorophylles *a* et *b* alors que les algues brunes sont caractérisées par la présence des chlorophylles *a* et *c* (Chen et al., 2018).

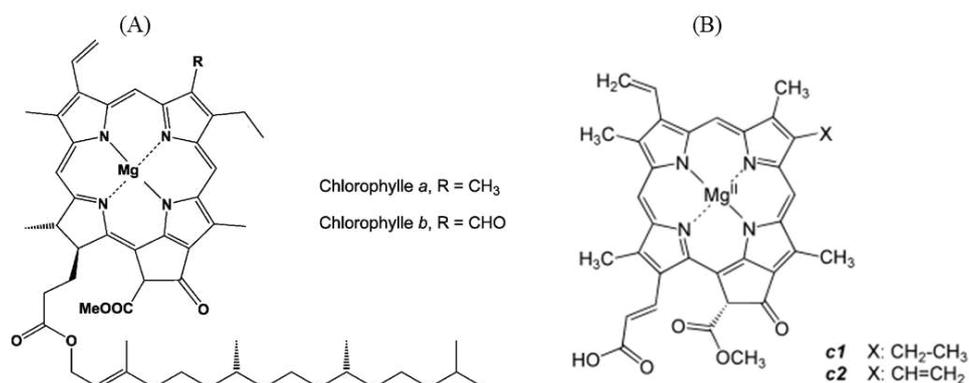


Figure 41. Structures des (A) Chlorophylles *a* et *b* et (B) de la Chlorophylle *c*.

III.2.2. Les phycobilliprotéines

Les phycobilliprotéines constituent un groupe de composés fluorescents, hydrosolubles, composés d'une protéine liée de manière covalente par ses résidus cystéine à des tétrapyrroles linéaires connus sous le nom de phycobilines. C'est un pigment accessoire utilisé pour la collecte de la lumière. Les phycobilines sont des tétrapyrroles comme les chlorophylles, mais ne possèdent ni une chaîne latérale et ni l'ion magnésium (**Figure 42**).

Les phycobilines se trouvent essentiellement chez les cyanobactéries, comme la spiruline, et les algues rouges et peuvent être divisées en quatre grandes catégories selon leurs propriétés spectrales telle que la phycoérythrine de couleur rouge-orange, phycocyanine de couleur bleue, l'allophycocyanine de couleur bleu-vert et phycoérythrocyanine de couleur violette (Pagels et al., 2019).

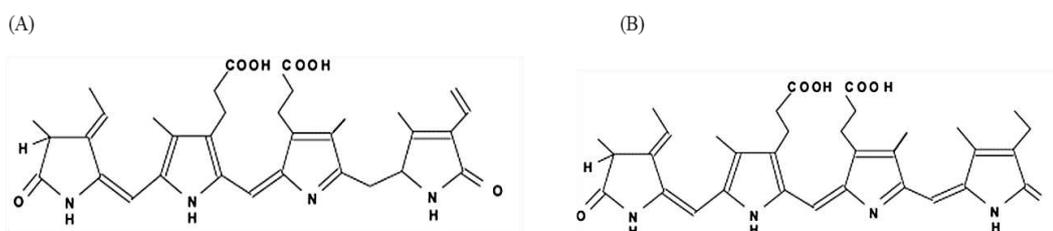


Figure 42. Structures des (A) Phycocyanobiline et (B) Phycoérythrobin.

III.2.3. Caroténoïdes

Plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés à ce jour. Il s'agit de pigments non polaires liposolubles. Ils appartiennent à la classe des terpénoïdes ayant des chaînes de polyène hautement conjuguées qui leur confèrent diverses propriétés. Les caroténoïdes sont caractérisés par leur longueur, leur taille, leurs groupements fonctionnels, leur isomérisation ainsi que leurs polarités. Toutes ces caractéristiques structurales jouent un rôle important dans la détermination

du spectre d'absorption et de la coloration (Viñas-Ospino et al., 2023). Les caroténoïdes peuvent être classés en deux groupes différents à savoir les carotènes, qui sont des hydrocarbures insaturés ou des hydrocarbures purs comme le β -carotène et le lycopène et les xanthophylles, qui sont les dérivés oxygénés (alcooliques), très similaires aux carotènes mais qui ont au moins un groupe fonctionnel et contenant de l'oxygène comme lutéine, zéaxanthine et fucoxanthine (Bhatt et al., 2020) (**Figure 43**).

La structure de base des caroténoïdes est composée de huit unités isoprènes (polyisoprénoïde), dont chacune est formée de cinq carbones, ramifiés et répétés constituant une molécule de 40 carbones contenant des liaisons conjugués (Mosquera et al., 2021). Les caroténoïdes peuvent exister sous deux principales formes géométriques à savoir la forme *trans* stable et la forme *cis* moins stable. La richesse en liaisons conjuguées est une caractéristique des caroténoïdes qui leur confèrent un potentiel réducteur en raison de leur capacité à transférer des électrons, à absorber la lumière et à rendre les caroténoïdes aptes à réaliser l'oxydation et l'isomérisation (Rodrigo-Baños et al., 2015). De ce fait les caroténoïdes jouent un rôle clé dans la photoprotection en inactivant les ROS. Aussi, ils sont capables d'absorber et de transmettre la lumière aux chlorophylles (Tapiero et al., 2004).

Les caroténoïdes tels que l' α -carotène, le β -carotène, le γ -carotène et la β -cryptoxanthine contiennent un cycle β -ionone. Ces composés peuvent être convertis par l'organisme en vitamine A et jouer un rôle protecteur contre diverses maladies.

Le marché mondial des caroténoïdes était évalué à 1,24 milliard USD en 2016 et a dépassé 1,53 milliard USD en 2021 (Ambati et al., 2019). L'alimentation humaine et animale, la cosmétique et le domaine nutraceutique représentent les principales applications industrielles des caroténoïdes. En fait, le secteur de l'alimentation animale était le plus grand consommateur de caroténoïdes en 2014 avec une part du marché de l'ordre de 47% [19]. De plus, les caroténoïdes sont considérés comme agents conservateurs pour ralentir le processus d'oxydation, réduisant ainsi la dégradation des aliments. En raison de leurs propriétés

antioxydantes et leur haute valeur nutritive pour la peau et les cheveux, les caroténoïdes sont utilisés en cosmétique comme ingrédients des crèmes et des lotions.

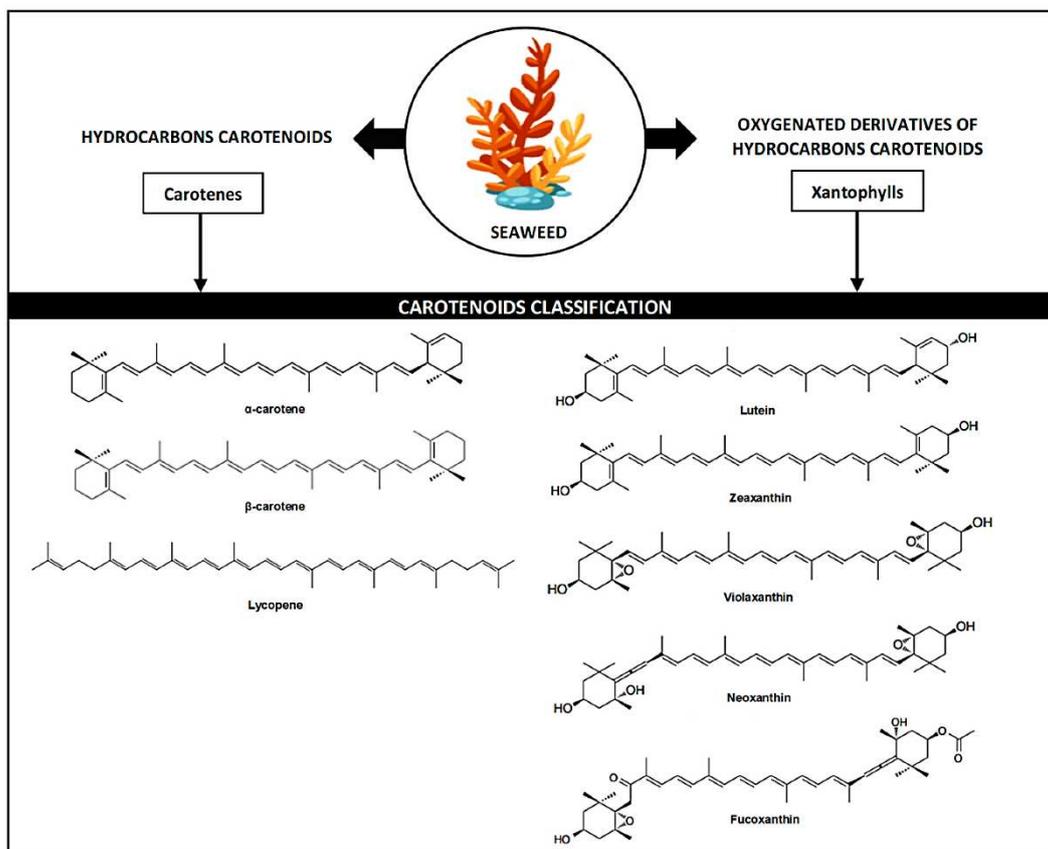


Figure 43. Classification des caroténoïdes des macroalgues (Din et al., 2022).

III.2.3.1. Les fucoxanthines

III.2.3.1.1. Généralités sur les fucoxanthines

Les fucoxanthines représentent environ 10% des caroténoïdes produits dans la nature (Abu-Ghannam et al., 2017). C'est un pigment caractéristique des algues brunes leur conférant la couleur brunâtre. Les fucoxanthines sont des caroténoïdes du monde marin connu sous le nom de xanthophylles marines. Il s'agit de métabolites secondaires abondants dans les plastes des algues brunes. La formule brute de la fucoxanthine est $C_{42}H_{58}O_6$, ayant à un poids moléculaire de 658,9 g/mol.

D'un point de vue structural, les fucoxanthines ont des structures proches de plusieurs caroténoïdes, avec certaines particularités comme la liaison allénique, les neuf doubles liaisons conjuguées et le groupement oxygéné. En plus, les groupements fonctionnels oxygénés constitués par des groupements époxy, hydroxyle, carboxyle et carbonyle (**Figure 44**). Les fucoxanthines peuvent être dégradées pendant leur stockage suite à une exposition à la chaleur, à la lumière, à l'oxygène, aux lipides insaturés et autres (Xiao et al., 2020).

La formation de la *cis*-fucoxanthine par isomérisation est étroitement liée aux conditions d'extraction et de purification (**Figure 44**). En fait, l'augmentation de la fraction des isomères *cis* de la fucoxanthine à cause de l'augmentation de la température d'extraction est corrélée avec une diminution de l'activité antioxydante (Kawee-Ai et al., 2013).

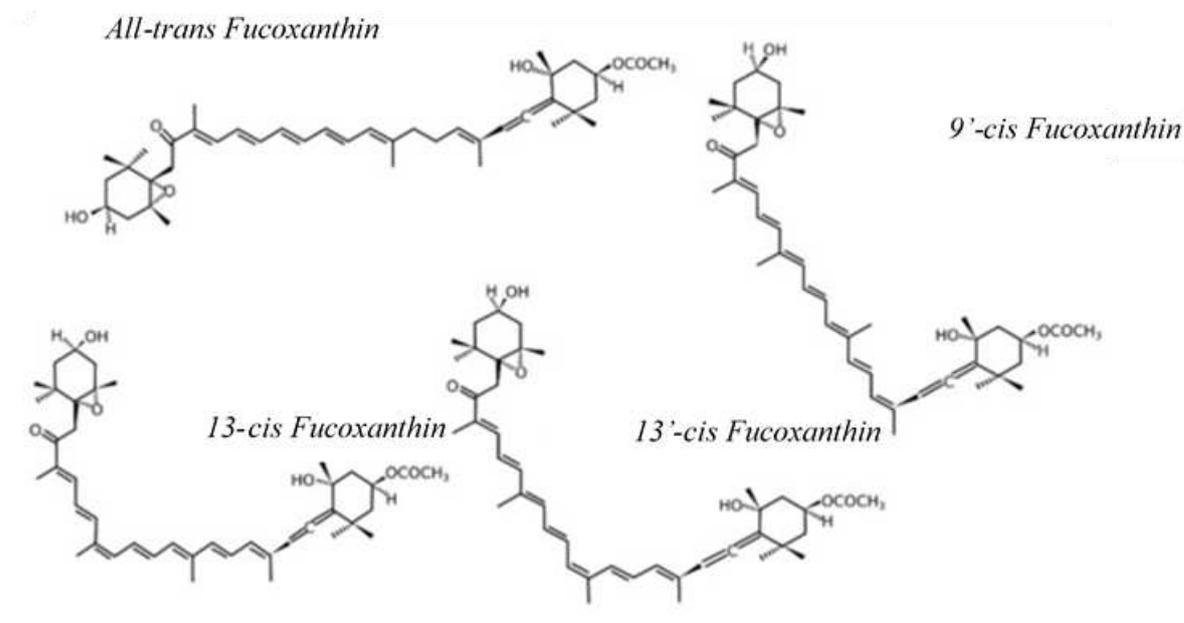


Figure 44. Les isomères de fucoxanthine : all-trans fucoxanthine, 9-cis fucoxanthine, 13-cis fucoxanthine, 13' - cis fucoxanthine (Pajot et al., 2022).

III.2.3.1.2. Activités et applications biologiques

Plusieurs études ont rapporté l'activité antitumorale de la fucoxanthine extraite, par exemple, de la macroalgue brune *Hijikia fusiforme*. Cette dernière a diminué l'expression du gène N-myc en induisant l'arrêt de la prolifération de cellules cancéreuses la croissance humaine de la lignée cellulaire de neuroblastome GOTO (Mumu et al., 2022). Les fucoxanthines présentent d'autres effets biologiques à savoir antioxydant, anti-inflammatoire, anti-obésité, anti-diabète, antipaludique ou hépato-protecteur (Zhang et al., 2015). A titre d'exemple, le Xanthigen est un produit commercial à base de fucoxanthine, non toxique, ayant un effet anti-obésité. Des études ont montré qu'il est capable de réduire la teneur en graisse corporelle avec une amélioration de la fonction hépatique (Muradian et al., 2015). Le FucoVital est un autre produit commercialisé à base de fucoxanthines capable d'améliorer la santé du foie (Lourenço-Lopes et al., 2021). Les propriétés cosmétiques de la fucoxanthine ont été illustrées dans plusieurs autres études. Par exemple, la fucoxanthine entre dans la formulation de nanoparticules lipidiques solides dans des crèmes anti-UV (Liu et al., 2020). Elles entrent également dans la formulation de produits cosmétiques utilisés dans le blanchiment de la peau

et sont aussi considérées comme des agents anti-âge (Lourenço-Lopes et al., 2021). Notons que les fucoxanthines ont été exploités dans le domaine d'alimentation humaine et animale. L'incorporation d'extraits des macroalgues riches en fucoxanthines dans les pâtes à base de semoule a amélioré leur valeur nutritionnelle (Din et al., 2022). Gumus et al. (2018) ont démontré que l'administration de fucoxanthines aux poulets a amélioré la couleur et la qualité de la viande.

III.2.3.2. β -carotènes

Le β -carotène est un métabolite secondaire synthétisé par différents organismes à savoir des plantes, des micro-organismes et des algues. Il appartient à un groupe de composés non oxydés des caroténoïdes. C'est un composé polyène, dérivé de la structure acyclique, $C_{40}H_{56}$ et possède une longue chaîne de doubles liaisons conjuguées. La température élevée favorise l'isomérisation des doubles liaisons, ce qui se traduit par éclaircissement de leur couleur (Kumar et al., 2020). Le β -carotène est un précurseur de la vitamine A ayant une structure semblable à la molécule de rétinol. Comme la majorité des caroténoïdes, le β -carotène présente des propriétés lipophiles (Maurya et al., 2021). Il se trouve naturellement sous forme de deux isomères (all-trans et 9-cis-trans β -carotène) (**Figure 45**). Il se caractérise par ses propriétés antioxydante et anticancéreuse. Il est capable de protéger la peau contre le vieillissement et permet de contrôler le teneur en cholestérol diminuant ainsi le risque des maladies cardiovasculaires (Amengual et al., 2011). Les propriétés du β -carotène ont fait de ce composé un additif alimentaire d'intérêt. Le β -carotène de la microalgue *Dunaliella salina* est approuvé comme colorant alimentaire (E160) par la commission européenne (EFSA, 2012 ; Levasseur et al., 2020). Actuellement, ce colorant est largement utilisé dans l'industrie alimentaire pour pigmenter les gâteaux, le beurre, la margarine, le lait et les boissons. A l'échelle mondiale, le β -carotène est essentiellement obtenu à partir des moules *Blakeslea Trispora* et de cultures de *Dunaliella salina* (Bogacz-Radomska et al., 2018). *Dunaliella salina* est la principale source commerciale naturelle de β -carotène d'origine microbiologique. Le marché mondial du β -carotène a dépassé 520 millions USD en 2020 et devrait atteindre 780 millions USD d'ici 2027 (Patel et al., 2022).

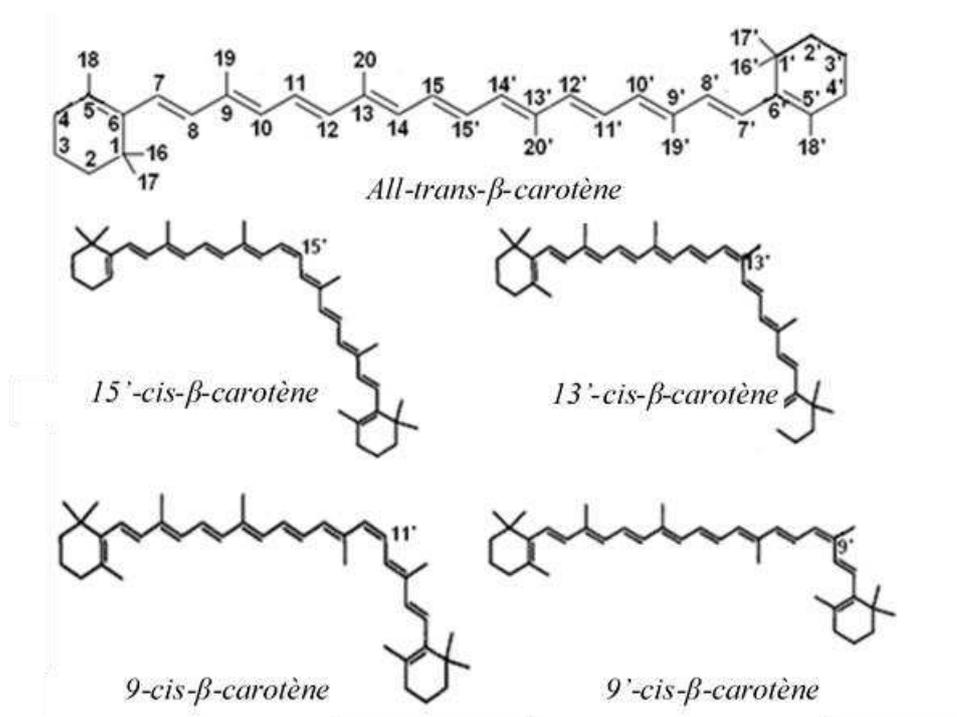


Figure 45. Les isomères de β -carotène : all-trans- β -carotène, cis- β -carotène (Patel et al., 2022).

IV. Quelles applications potentielles des macroalgues, notamment d'origine tunisienne, en 2023 ?

IV.1. Lutte contre le diabète

Outre les applications alimentaires et cosmétiques des caroténoïdes, ces composés peuvent être utilisés dans le domaine médical. En effet, la mondialisation, l'industrialisation et les changements de l'environnement, du comportement et du mode de vie ont entraîné une augmentation des taux d'obésité et de diabète. Le diabète est un problème de santé mondiale et il est estimé comme la cinquième principale cause de décès direct ou indirect dans le monde (Roglic et al., 2005). En Tunisie, 18% de la population souffre de diabète. En fait, elle constitue l'une des dix premières causes de décès dans le pays. La Fédération internationale du diabète (FID) a estimé que le nombre de cas de diabète devrait passer de 285 millions personnes en 2009 à 438 millions personnes dans le monde en 2030.

Biologiquement, le diabète est une maladie chronique grave caractérisé par une hyperglycémie permanente, ainsi que la présence des taux élevés de glucose et de corps cétoniques dans les urines. On distingue deux types de diabète, le diabète de type I, qui est insulino-dépendant et dont l'origine est auto-immune. Le manque absolu d'insuline provient d'une destruction des cellules β des îlots de Langerhans au niveau de pancréas. Le diabète de type II, non-insulino-dépendant, touche essentiellement les sujets obèses. Ce type de diabète est lié à un défaut de résistance à l'insuline (défaut d'action). Ce type de diabète est caractérisé par une insulino-résistance au niveau des récepteurs des muscles, du foie et du tissu adipeux.

Le taux de glycémie chez les sujets qui souffrent de diabète doit être réduit et maintenu dans un intervalle normal par différentes approches, tels que le régime alimentaire, les médicaments et l'exercice physique (Zaharudin et al., 2019). L'augmentation des niveaux de glucose, peut entraîner d'autres complications dérivées de la décompensation métabolique (Asemi et al., 2016). Les facteurs liés à son développement comprennent les conditions métaboliques et génétiques, ainsi que certaines habitudes alimentaires, le manque d'activité physique, le tabagisme, la consommation d'alcool et le surpoids (World Health Organization., 2016). Parmi celles-ci, l'alimentation est un facteur primordial pour la prévention contre cette maladie. Ainsi, une alimentation de haute qualité nutritionnelle est indispensable pour les sujets atteints de DT2 (Beydoun et al., 2019).

Plusieurs approches pharmacologiques sont utilisées pour contrôler et réguler le diabète en se basant sur différents modes d'action tels que la stimulation de la libération d'insuline, l'augmentation de l'activité de transport du glucose, l'inhibition de la gluconéogenèse et la réduction de l'absorption du glucose au niveau des intestins.

Plusieurs thérapies actuellement disponibles, telle que l'administration de l'insuline et de divers agents antidiabétiques, sont utilisées pour une meilleure régulation glycémique (Jung et al., 2006). Cependant, un grand nombre de ces agents antidiabétiques ont une efficacité insuffisante, et présentent des effets secondaires graves comme l'acarbose, le voglibose et la nojirimycine (Lee et al., 2014). La recherche et l'investigation de nouveaux agents hypoglycémiant plus efficaces, provenant de sources naturelles, contribue à l'évolution de la phytothérapie (Gupta et Abu Ghannam et al., 2011).

Les composés bioactifs dérivés des macroalgues possèdent des propriétés antidiabétiques et sont généralement utilisés comme supplément alimentaire pour la gestion du diabète (Kim et al., 2011). Plusieurs études ont révélé que des extraits d'algues comme *L. japonica* et *H. fusiforme*, *Sargassum oligocystum*, *Sargassum wightii*, *Ulva fasciata* et *S. polycystum* (Motshakeri et al., 2013) présentaient des activités antidiabétiques et agissaient à différents niveaux. Plusieurs études ont montré que certaines molécules bioactives ayant des effets antidiabétiques présentent un effet significatif contre l'obésité (Maeda et al., 2009). A titre indicatif, il a été suggéré que l'activité antidiabétique des fucoïdanes est associée à la régulation de la sécrétion d'adipocytokines, (Maeda et al., 2009). Les activités antidiabétiques pourraient être dues à la diminution de la résistance à l'insuline en augmentant le rapport glucokinase hépatique/glucose-6-phosphatase, le glycogène et en régulant également l'expression de l'ARNm de transporteur de glucose (GLUT4) dans les tissus musculaires squelettiques (Maeda et al., 2009). Aussi, plusieurs molécules bioactives extraites de macroalgues brunes pourraient être utilisées afin de réguler l'expression des gènes AKT, AMPK, CIUT2, INSR et PI3K contrôlant le transport du glucose, le métabolisme du glucose et l'homéostasie glucidique lors de la synthèse du glycogène et de la gluconéogenèse (Manning et al., 2009). Daub et al. (2020) ont d'ailleurs montré l'implication de l'inhibition de certaines enzymes dont l' α -amylase et de l' α -glucosidase dans la régulation de la glycémie.

Une des approches thérapeutiques du diabète consiste en la réduction de la digestion des glucides par inhibition de l' α -amylase, ce qui conduit à la réduction du taux de glucose sérique, réglant ainsi le taux de la glycémie postprandiale. L' α -amylase est une enzyme du tube digestif qui appartient à la famille des glycosides qui décompose l'amidon en glucose en agissant sur la

liaison glycosidique α -(1,4). Les inhibiteurs de l'amylase sont aussi appelés bloqueurs d'amidon en raison de leur activité enzymatique capable de diminuer le taux de conversion de l'amidon (Marshall et Lauda et al., 1975) (**Figure 46**). Il a été décrit que les caroténoïdes pouvaient inhiber cette enzyme en formant des liaisons hydrogènes entre les groupement -OH des fucoxanthines et les résidus Glu233 et Asp197 de l' α -amylase contribuant ainsi à la diminution de la glycémie après un repas ainsi qu'à la diminution de l'accumulation des lipides.

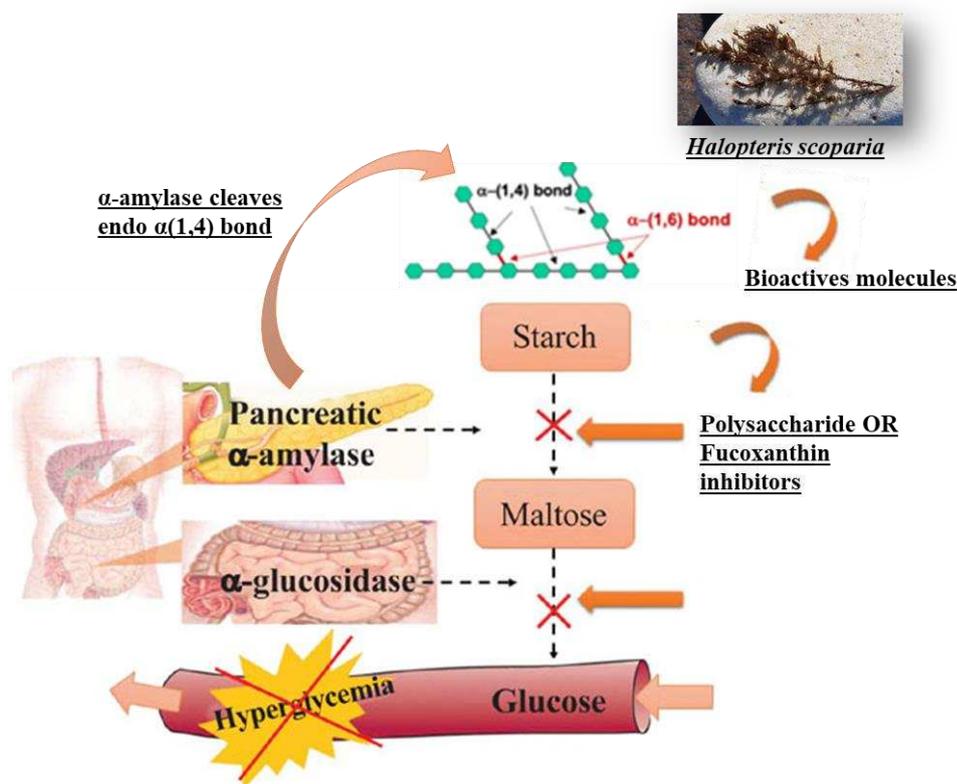


Figure 46. Mécanisme de régulation de l'hyperglycémie. Inhibition de l' α -amylase et l'hydrolyse de l'amidon par des molécules bioactives à savoir des polysaccharides ou des pigments.

Ils existent plusieurs autres voies de régulation de l'hyperglycémie post-prandiale. Des travaux génétiques ont montré que l'utilisation de la trypsine permet l'inhibition de l'insuline et que cette action est immédiate, l'insuline pouvant être récupérée en augmentant l'acidité de la solution. Plusieurs autres études indiquent que si la trypsine est injectée directement après l'administration de l'insuline, l'action de cette dernière est inhibée (Morita et al., 2021). De ce fait, l'inhibition de la trypsine par la fucoxanthine et le β -carotène permet le maintien du taux d'insuline dans le sang. En outre, Snook et al. (1968) ont signalé une diminution de la concentration d'amylase pancréatique après administration des inhibiteurs de trypsine à des rats diabétiques.

L'administration de caroténoïdes permet aussi de réguler plusieurs autres voies. Le développement de l'obésité entraîne une augmentation de sécrétion des adipokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), l'interleukine-6 et la protéine chimiotactique des monocytes-1. Les adipokines pro-inflammatoires induisent une infiltration des macrophages dans les tissus adipeux abdominaux, conduisant à une inflammation chronique. En outre, l'excrétion des adipokines augmenteraient la sensibilité de l'insuline d'une part et d'autre part, la supplémentation en fucoxanthines (de manière significative) inhiberait l'infiltration des macrophages et régulerait l'expression et la sécrétion d'adipokines dans le tissu adipeux abdominal entraînant ainsi une amélioration de la résistance à l'insuline et la régulation des niveaux de glucose sanguin (Gammonne et al., 2015). Des études ont rapporté que la fucoxanthine extrait de macroalgues inhibait le développement du tissu adipeux chez les souris diabétiques modèle KK-A^y (Maeda et al., 2005). L'utilisation de fucoxanthine a également modulé la glycémie et le taux d'insuline en supprimant l'expression des protéines chimiotactique des monocytes-1 (PCM-1) tout en favorisant l'expression du récepteur β 3-adrénergique (b3Adr) et l'expression du transporteur de glucose 4 (GLUT4) chez les souris modèles (Maeda et al., 2009). Elle joue également un rôle en inhibant l'accumulation des lipides ainsi que la peroxydation lipidique des hépatocytes *via* la régulation de la voie de signalisation Sirt1/AMPK (Chang et al., 2018). En outre, le fucoxanthinol, un dérivé de la fucoxanthine, aggrave l'inflammation induite par l'obésité dans les cellules adipocytes (Maeda et al., 2015). Un autre mécanisme possible pour l'étude de l'effet antidiabétique des fucoxanthines est la régulation du transporteur de glucose 4 (GLUT4). En effet, la protéine GLUT4 est l'isoforme prédominant des transporteurs du glucose exprimé en abondance dans le muscle squelettique et le tissu adipeux. Avec l'insuline et d'autres stimulateurs, l'expression des protéines GLUT4, se déplacent rapidement vers le plasma, ce qui favorise l'absorption du glucose. Cependant, dans le diabète de type 2, la signalisation de l'insuline est altérée et l'expression de GLUT4 et sa translocation sont atténuées (Maeda et al., 2015). Plusieurs études sur le modèle souris ont montré que lorsque des souris ont pris des régimes riches en graisses, ces souris ont présenté une hyperglycémie, une hyperinsulinémie et une hyperlipidémie avec une diminution significative des niveaux de protéine GLUT4 dans leurs muscles. L'administration de fucoxanthines a induit une augmentation significative des niveaux d'expression de l'ARNm de GLUT4 suite à l'activation de coactivateur PGC-1 α qui a été impliqué dans la régulation de la biogenèse mitochondriale et l'activation de GLUT4.

Parmi d'autres composants de l'alimentation, il a été démontré que le β -carotène joue un rôle dans l'adipogenèse, la lipolyse, la résistance à l'insuline et d'autres facteurs liés au DT2 (Beydoun et al., 2019). Une étude transversale avec des sujets males et femelles japonais a montré que la concentration de β -carotène dans le sérum était inversement corrélée à la résistance à l'insuline (Higuchi et al., 2015), indiquant un rôle protecteur possible de cet antioxydant pour les cellules β -pancréatiques (Matsumoto et al., 2020). Parmi ces individus, les hommes présentaient les plus faibles concentrations de β -carotène, et cette découverte a été attribuée au tabagisme et à la consommation d'alcool des participants, et donc une résistance à l'insuline plus élevée (Higuchi et al., 2015).

En fait, il a été rapporté que le tabac diminue les concentrations plasmatiques des caroténoïdes en raison de l'induction d'un stress oxydatif qui épuise ces composants. Il a également été démontré que le tabac peut être associée à une réduction de la biodisponibilité du β -carotène (She et al., 2017).

Une autre étude a souligné que les hommes sont plus susceptibles à développer un DT2 en raison des habitudes alimentaires (consommation plus élevée de calories) et diminution de l'exercice physique. La résistance à l'insuline est un point clé du DT2. Il se caractérise comme une réponse insuffisante des tissus aux effets de l'insuline circulante. L'état d'hyperglycémie entraîne une augmentation de la production des ROS, induisant ainsi une réponse inflammatoire, jouant aussi un rôle direct dans le développement des syndromes métaboliques (Lin et al., 2016). Dans le DT2, les macrophages et les neutrophiles, qui libèrent des espèces actives d'oxygène et de cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α et l'IL-1 β , sont activés, causant des dommages au niveau cellulaire (Yosae et al., 2016). Avec l'initiation des conditions oxydatives, il y a une aggravation de la sécrétion d'insuline et/ou une augmentation de la résistance due(s) aux dommages causés au niveau des cellules β -pancréatiques, aggravant la sévérité du DT2 (She et al., 2017). Notons que le stress oxydatif réduit la capture du glucose par les muscles et le tissu adipeux (Bonet et al., 2016). Une étude a montré que les individus, dans des conditions de stress oxydatif, présentent une augmentation accrue des concentrations de triglycérides et de glycémie, ainsi que des concentrations plus faibles en HDL. Qualitativement, ces individus ont consommé plus de sources contenant du β -carotène par rapport aux personnes en bonne santé. Une teneur élevée en triglycérides est couramment observée chez les individus avec le DT2, ce qui favorise le développement de l'hyperglycémie due à l'activation de gluconéogenèse (Dommermuth et al., 2018).

IV.2. Domaine de l'énergie

L'Homme a utilisé les macroalgues depuis des siècles et la demande des produits à base d'algues ne cesse d'augmenter. Les algues peuvent être utilisées soit pour la consommation directe soit servir de ressources pour être bioraffinées afin d'alimenter en molécules plateformes différents domaines comme l'agriculture, l'énergie, la cosmétique ou la pharmaceutique (Arora et al., 2021) (**Figures 47, 48**). L'utilisation des macroalgues dans le domaine des biofuels n'est pas négligeable avec un prix de vente de l'ordre de 50 USD /tonne sèche. Ces dernières sont également utilisées dans le domaine de la biochimie pour la production de composés de haute valeur biologique avec un prix de vente de 300 à 1 000 USD /tonne de matière sèche. Enfin, les macroalgues sont utilisées dans le domaine de l'alimentation animale et ont été aussi intégrées dans divers aliments occupant des marchés de vente, à des prix de vente entre 2 000 et 5 000 USD /tonne de matière sèche et 10 000 USD /tonne sèche, respectivement.

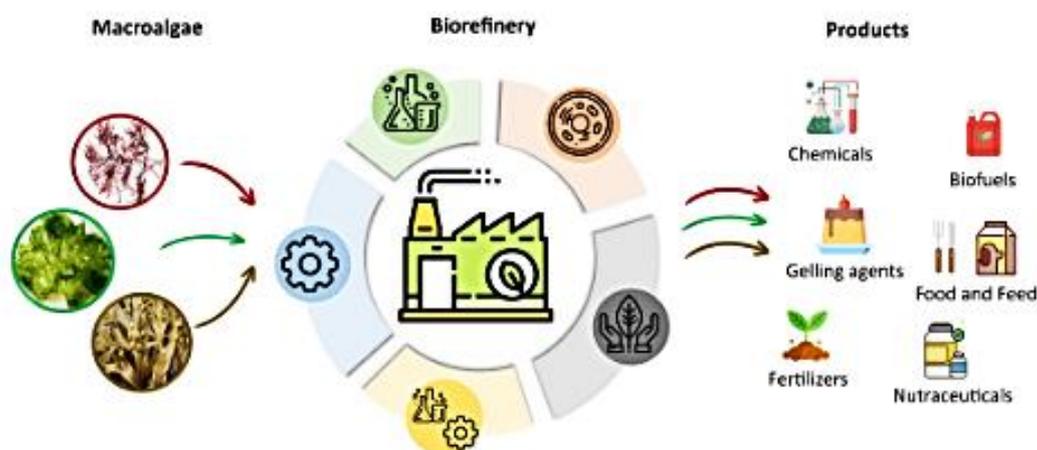


Figure 47. Schéma général de la bioraffinerie des macroalgues (Del Río et al., 2020).

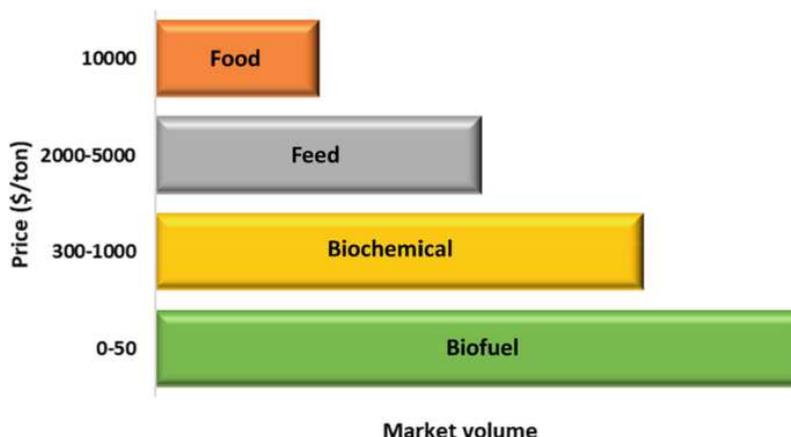


Figure 48. Marché des macroalgues depuis les dernières années (Bhagwat et al., 2022).

De nos jours, le remplacement des énergies fossiles combustibles par des alternatives durables et renouvelables est devenu un enjeu de société dont la portée est planétaire en raison de problèmes géopolitiques, de l'augmentation de la population mondiale, de l'augmentation massive des besoins en énergie, de la diminution des ressources pétrolières (et de fait l'augmentation du prix du pétrole brut), du réchauffement climatique. Plusieurs études ont estimé la croissance de la demande en énergie primaire jusqu'en 2050, évolution calculée à la hausse au regard aujourd'hui du contexte politique en Europe (Ramirez et al., 2013) (**Figure 49**).

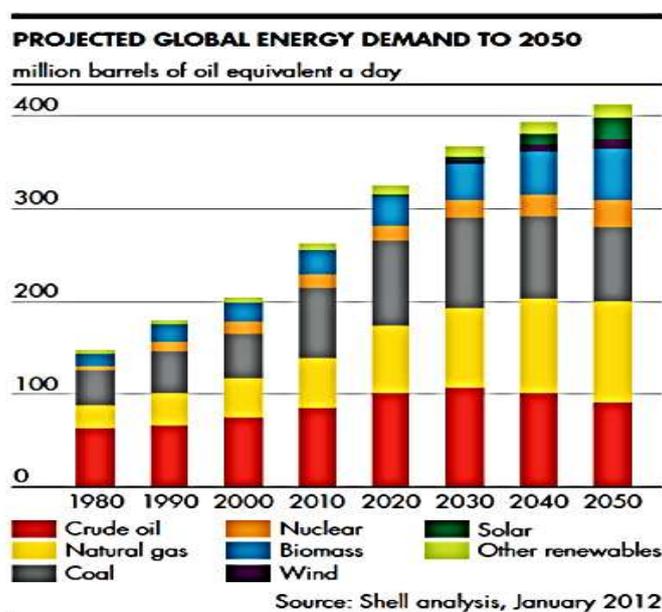


Figure 49. Estimation de la demande de l'énergie en 2050 (Sikkema et al., 2021).

Les biocarburants comme le bio-diesel, le bio-éthanol et le bio-hydrogène (bio-H₂) sont considérés comme des alternative potentielles aux carburants fossiles en raison de leur nature renouvelable et de leur durabilité, sans oublier les secteurs éoliens et photovoltaïques.

Plusieurs études ont estimé une forte augmentation de l'utilisation des énergies renouvelables qui passeraient à plus de 32% en 2030 (Sikkema et al., 2021) (**Figure 50**) et selon le rapport International Energy Outlook, la consommation mondiale d'énergie augmentera de 40% entre 2021 et 2040. Cette augmentation est corrélée avec une diminution de l'utilisation des énergies fossiles (International Energy Outlook 2017 et World Energy Outlook, 2022).

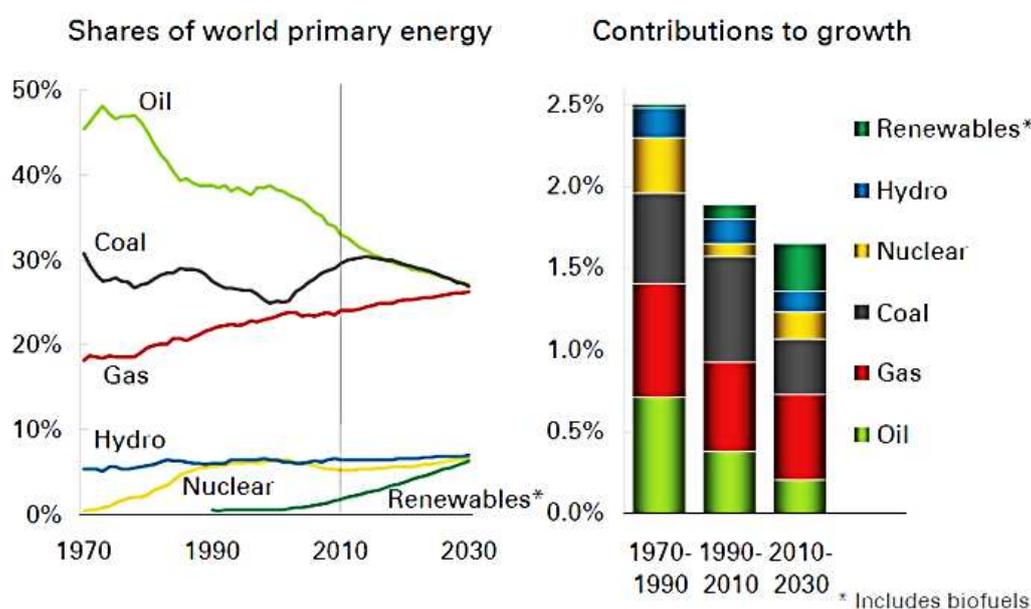


Figure 50. Evolution des sources d'énergie primaire [20].

En raison de la non-durabilité potentielle des carburants de première génération, des efforts ont été fournis pour la production de biocarburants de deuxième génération. Ces biocarburants sont fabriqués à partir de biomasses lignocellulosiques, de co-produits agricoles et/ou industriels *via* différents types d'unité de transformation. Des sources de biomasse à croissance rapide et renouvelables telles que les algues marines se présentent aujourd'hui comme une voie supplémentaire de production de biocarburants sur les mêmes bases de bioraffinerie que les végétaux supérieurs (biocarburants de troisième génération) (Kumar et al., 2021). La biomasse macroalgale est riche en glucides (jusqu'à 75% de leur poids sec) potentiellement fermentescibles ou convertibles en vecteurs énergétiques. Plusieurs macroalgues peuvent produire de l'énergie avec une plus grande efficacité par rapport aux biocarburants traditionnels en raison de leur haute productivité de biomasse ainsi que leur

prolifération importante dans les plages polluées et le littoral. En outre, les macroalgues peuvent être cultivées dans l'eau, et n'entrent pas en concurrence avec les aliments et les cultures terrestres, même si des problématiques liées à l'eau et au sel (eau de mer) se posent. Cultivables en aquaculture, collectables sur site ou après échouage pour des coûts maîtrisables, les biomasses algales possèdent en général une meilleure efficacité photosynthétique que les cultures terrestres, qui nécessitent en plus l'ajout d'additifs agricoles (engrais, pesticides, ...) (Ruiz et al., 2013).

Le processus biologique de conversion énergétique de la biomasse algale en carburants inclut la conversion biochimique (et la chimie directe), la conversion thermochimique et la combustion directe (Ghedini et al., 2021) (Figure 51).

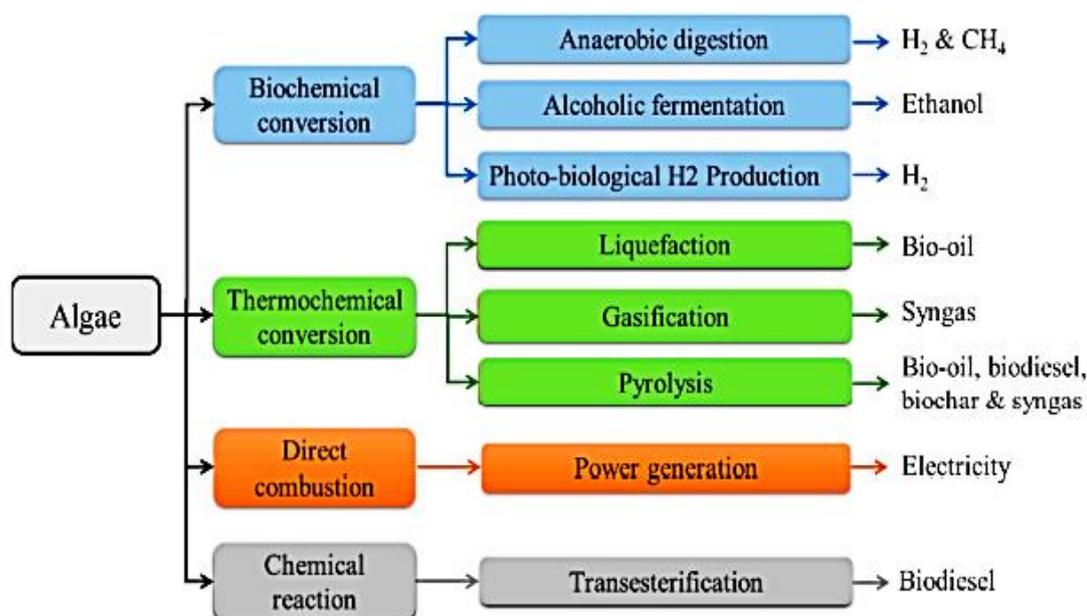


Figure 51. Différentes voies de conversion de la biomasse des macroalgues en énergie (Ghedini et al., 2021).

IV.2.1. Processus de conversion énergétique

IV.2.1.1. Conversion biochimique

Cette conversion peut être réalisée par différentes méthodes (Smichi et al., 2022), qui nécessitent souvent des pré-traitements biochimiques afin de libérer le maximum de sucres fermentescibles. L'hydrogène, l'un des vecteurs énergétiques les plus intéressants aujourd'hui, peut être produit par des méthodes de digestion photobiologique (Kumar et al., 2016). Le bio-éthanol est une source énergétique produite par fermentation. Cette méthode consiste en la conversion des sucres fermentescibles des algues en bio-éthanol par des micro-organismes

fermentaires (e.g. digestion anaérobie par des levures). Par conséquent, la présence et l'accessibilité des sucres dans les algues est importante dans la production du bio-éthanol et l'obtention de rendements décents. Notons qu'un mélange de méthane (autre bioénergie) et de dioxyde de carbone sous forme de biogaz, en plus de quantités d'ammoniac, est normalement produit grâce à la digestion anaérobie de la biomasse algale (Sivaramakrishnan et al., 2022).

IV.2.1.2. Conversion thermique

La conversion thermochimique est un processus de production de trois carburants différents, incluant les bio-huiles (essence, carburacteur, bio-diesel), le biogaz et le biochar, à des températures élevées et en absence d'oxygène. Lors du processus de pyrolyse, deux sources importantes d'énergie, dont l'hydrogène et les bio-huiles, sont produites. De plus, l'hydrogène peut être produit par des méthodes de gazéification. Dans le processus de liquéfaction, la biomasse humide peut être décomposée en composants plus petits puis polymérisés de nouveau en constituant des composants huileux ou biocarburants liquides (Adamczyk et al., 2018).

IV.2.1.3. Combustion directe

Dans les centrales bioélectriques, la biomasse est directement brûlée en présence de l'air pour chauffer l'eau placée dans une chaudière et produire de la vapeur à haute pression. La vapeur fait tourner une turbine génératrice, générant de l'électricité (Milledge et al., 2014).

IV.2.1.4 Réaction chimique

Parmi les sources de bioénergie, le bio-diesel est considéré comme le carburant de transport particulièrement adapté aux moteurs diesel. Les huiles et les lipides dans la structure des algues peuvent être une source pour la production de bio-diesel renouvelable et à caractère moins polluant. La conversion de métabolites secondaires par des micro-organismes (e.g. *Yarrowia* sp.) permet également de générer des profils d'acides gras transestérifiables. Brièvement, la transestérification est le processus à partir duquel les huiles extraites des algues sont converties en bio-diesel en présence d'alcool et d'un catalyseur acide ou basique (Saengsawang et al., 2020).

IV.2.1.4.1. Production de bio-éthanol à partir des biomasses algales

La pandémie mondiale du coronavirus en 2019 a entraîné une augmentation de 1 400% la demande de désinfectants pour les mains en trois mois (entre décembre 2019 et février 2020) [21].

Selon les estimations de Fior Markets, les ventes de désinfectant des mains pourraient passer de 1,2 milliard USD en 2019 à 2,14 milliards USD en 2027 [21]. Les biomasses riches en sucres fermentescibles sont généralement utilisées comme un substrat dans un processus microbiologique de fermentation à l'aide de micro-organismes, principalement des levures et des bactéries (Daroch et al., 2013). La composition biochimique de la matière première utilisée est un facteur influant le rendement en bio-éthanol. Les glucanes sont facilement convertis en éthanol (Yanagisawa et al., 2011), mais généralement la teneur des macroalgues en glucane est faible, de l'ordre de (22-24,5% chez *Chaetomorpha linum*) (Schultz-Jensen et al., 2013). De ce fait la production du bio-éthanol exige la conversion de leurs carbohydrates en substrats fermentescibles (Wargacki et al. 2012). Plusieurs études montrent que les macroalgues rouges, vertes et surtout brunes, soumises à une fermentation anaérobie, en utilisant différentes souches telles que *S. cerevisiae* ou *P. angophorae*, pouvaient permettre la production de l'éthanol à des rendements intéressants. Par exemple, *L. hyperborean*, *J. rubens*, *U. lactuca* ou *Sargassum latifolium* ont été caractérisées comme matière première pour la production de bio-éthanol par un procédé de fermentation de leurs sucres (Soliman et al., 2018). D'autres études montrent que la microalgue *C. vulgaris* est une bonne bioressource pour la production de bio-éthanol, en raison de sa richesse en amidon-like (soit 37% de son poids sec). Cette microalgue possède une efficacité de production d'éthanol qui dépasse 65% (Ho et al., 2013). La production de bio-éthanol se déroule en trois étapes : un pré-traitement, une hydrolyse et une fermentation (**Figure 52**).

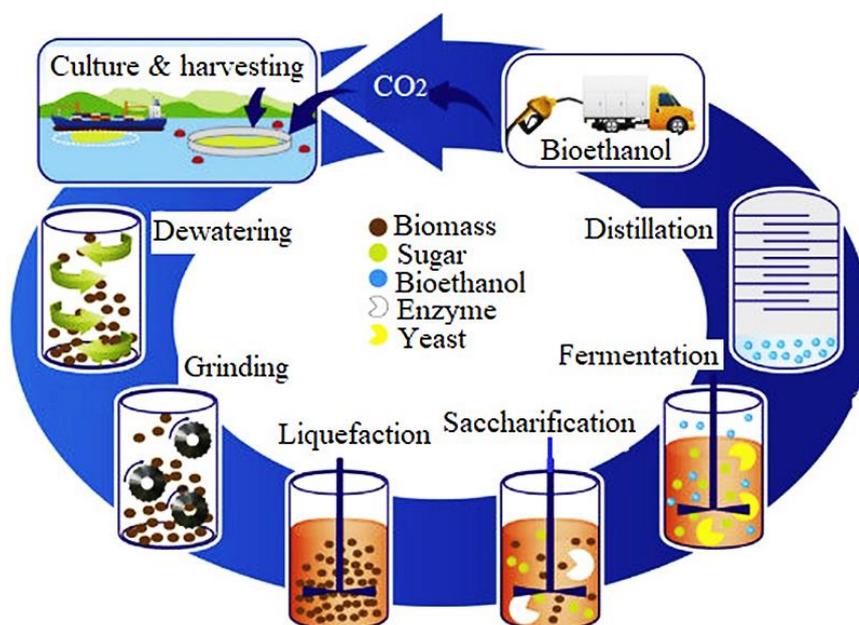


Figure 52. Conversion de macroalgue en bioéthanol (Ungureanu et al., 2020).

IV.2.1.4.1.1. Pré-traitement des macroalgues

Le pré-traitement des macroalgues est une étape essentielle pour la décomposition de la couche externe de la paroi cellulaire et pour libérer des biomolécules telles que la cellulose et les galactanes et les glucanes, afin qu'ils puissent être convertis en bio-éthanol. Plusieurs types de pré-traitements peuvent être appliqués. Un processus de pré-traitement efficace est celui qui est capable de réduire la production d'inhibiteurs de fermentation et de produire des sucres fermentescibles, principalement le glucose et le galactose (Ahmed et al., 2021). Le pré-traitement mécanique comprend trois étapes à savoir le lavage, le séchage et le broyage. Des études ont montré qu'après le broyage les particules les plus petites sont les plus efficaces pour la production de bio-éthanol en raison de leurs superficies (amélioration des coefficients d'échange) (Sudhakar et al., 2020). Un pré-traitement chimique permet quant à lui essentiellement la dépolymérisation de la cellulose suite à l'utilisation de l'acide dilué (Trivedi et al., 2016). Ce type de traitement génère toutefois de nombreux inhibiteurs, problématique lors de l'étape de fermentation. Des pré-traitements enzymatiques peuvent également être réalisés (à des coûts parfois prohibitifs), par exemple à l'aide de cellulases, agarases, amylases, l'objectif étant d'hydrolyser les PS complexes de macroalgues afin de libérer des motifs fermentescibles. Le pré-traitement thermique est aussi efficace pour la libération des sucres des macroalgues, avec une génération d'inhibiteur parfois difficilement contrôlable (Ahmed et al., 2021).

IV.2.1.4.1.2. Hydrolyse des macroalgues

Il existe trois type d'hydrolyse, à savoir l'hydrolyse acide moyennant l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique, l'hydrolyse alcaline par l'hydroxyle de sodium et l'hydrolyse enzymatique utilisant des cellulases par exemple (Ahmed et al., 2021).

IV.2.1.4.1.3. La fermentation des macroalgues

Les sucres réducteurs produits peuvent être convertis en éthanol par fermentation à l'aide de micro-organismes. De ce fait, l'éthanol est le principal produit de la fermentation avec autres molécules, à savoir l'eau et le dioxyde de carbone (Sudhakar et al., 2020) (**Equation 1**).



Le facteur principal qui affecte la production de bioéthanol est le choix du micro-organisme fermenteur. *Saccharomyces cerevisiae* a été utilisé dans différentes études en raison de son rendement de conversion élevé en éthanol, de son taux de fermentation (Khalid et al.,

2019). Il existe deux façons de produire de l'éthanol à partir de glucose et de galactose soit par le voie d'Embden-Meyerhof ou de Leloir. La première consiste en la conversion des sucres réducteurs en un intermédiaire commun (glucose-6-phosphate), converti par la suite en pyruvate (Jambo et al., 2016). Les produits obtenus vont subir une fermentation alcoolique pour être transformés en éthanol et en dioxyde de carbone (Jang et al., 2012). En revanche, la voie de Leloir consiste en la conversion du galactose-1-phosphate en glucose-1-phosphate puis en glucose-6-phosphate, cette voie étant un peu plus complexe (Ra et al., 2016).

Le rendement en sucres réducteurs et en bio-éthanol, dépend non seulement des espèces de macroalgues mais aussi de la méthode de l'hydrolyse et de la fermentation des micro-organismes. Pour la plupart des études, le faible rendement en bio-éthanol par rapport aux quantités élevé de sucres réducteurs est due à la présence de composés inhibiteurs naturels (à savoir les polyphénols, les sels et les métaux) ou par la production d'acides organiques.

De ce fait, deux approches ont été décrites pour diminuer la production de sous-produits toxiques. En effet, la première consiste en une étape de séparation entre les étapes d'hydrolyse et de fermentation. La deuxième consiste à réaliser l'hydrolyse et la fermentation simultanément.

IV.2.1.4.2. Fermentation anaérobique et production de biohydrogène

Le biohydrogène est une alternative prometteuse pour la production d'un vecteur énergétique à haute valeur énergétique (142 MJ/kg), deux fois supérieure à celle de gaz naturel (Singhania et al., 2012). Sorgulu et al. (2022) confirme aussi que la production d'un vecteur de biohydrogène à haute valeur énergétique (119,96 MJ/kg) est supérieure à celle de gaz naturel qui est de l'ordre de 47,78 MJ/kg. Selon les données de l'Agence internationale de l'énergie (AIE), afin d'atteindre zéro émission nette de CO₂ d'ici 2050, environ 306 millions de tonnes d'hydrogène vert (H₂) doit être produit annuellement (IEA et al., 2020). L'AIE rapporte que la production de H₂ devra donc croître de 66% et de 23% pour les périodes 2020-2030 et 2030-2050, respectivement. Notons qu'après la combustion du H₂, le H₂O est le seul sous-produit obtenu.

La généralisation de cette source d'énergie dans l'industrie automobile, le multimédia et le génie civil est prévue (Dayhim et al., 2014). Plusieurs voies biologiques de production du H₂ ont été étudiées telle que la fermentation sombre qui représente une voie intéressante pour la production d'hydrogène et le recyclage de nombreux types de déchets (Cheng et al., 2022). Le principal avantage de la fermentation sombre est la capacité des bactéries anaérobies à dégrader

de nombreux substrats complexes tels que des résidus agricoles, des biomasse lignocellulosique ou encore des co-produits d'origine algale (Eker et Sarp., 2017).

Le processus de la fermentation anaérobie dédiée à la production de biohydrogène est constitué de plusieurs étapes à savoir l'hydrolyse, la fermentation et l'acétogénèse (Nagarajan et al., 2022). Les trois étapes impliquent la dégradation de biopolymères et de la biomasse et leur conversion en acides gras volatils (AGV), suivie de la production de H₂ (**Figure 53**).

Clostridium, *Enterobacter* et *Bacillus* sont les principaux genres microbiens producteurs d'hydrogène à partir d'un substrat riche en glucides (Su et al., 2018). Le glucose est hydrolysé en acide acétique avec le dégagement de H₂ (**Equation 2**)



Dans le processus d'hydrolyse, des substances complexes dont les PS, les protéines et les graisses sont décomposées par les micro-organismes fermentatifs, souvent utilisés sous la forme de consortium bactérien (Hay et al., 2013).

L'acidogénèse, est la deuxième étape au cours de laquelle les substances organiques hydrolysées se dégradent et produisent du H₂, CO₂ et des acides gras volatiles (AGV) par des micro-organismes anaérobies. L'acétogénèse est la troisième étape du processus de fermentation au cours de laquelle il y a conversion des AGV en H₂, CO₂ et acide acétique. Lors de cette étape, les acétogènes sont les principaux microbes fermentaires. La génération d'hydrogène par des processus biologiques montre leur importance puisque le H₂ possède moins d'impact sur l'environnement (Mechery et al., 2019). La production d'hydrogène par fermentation anaérobie de la biomasse est renouvelable et la production d'énergie est durable est considérée comme une source d'énergie verte.

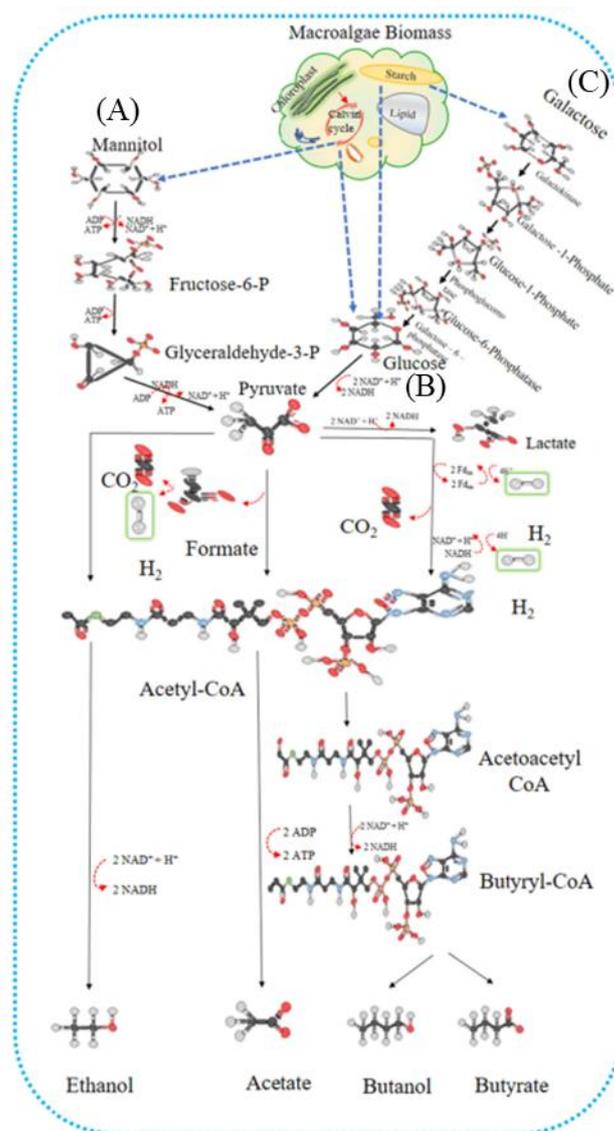


Figure 53. Différentes voies métaboliques pour la production de biohydrogène en utilisant (A) un mannitol, (B) du glucose et (C) du galactose comme substrat (Kumar et al., 2021).

IV.2.1.4.3. Production de bio-diesel des macroalgues

Le bio-diesel est une alternative du carburant liquide fossile issu d'une réaction chimique entre l'huile végétale ou graisse animale avec une courte chaîne d'alcool, tel que le méthanol, l'éthanol ou le butanol en présence d'un catalyseur. Au cours de cette réaction, le squelette glycérol des triglycérides (TG) est remplacé par du méthanol qui estérifie les acides gras, les chaînes latérales de TG, en esters méthyliques (bio-diesel). Une molécule de TG (composant de base des huiles d'algues) réagit avec un alcool de faible poids moléculaire, donnant un ester mono-alkylique et un sous-produit : la glycérine. La transestérification est une réaction

d'équilibre dans laquelle une molécule d'ester de triglycéride ou huile extraite d'algues et trois molécules d'alcool monohydrique réagissent pour produire un nouvel ester mono-alkylique ou bio-diesel et un sous-produit de glycérol (glycérine) (**Figure 54**). Les catalyseurs basiques ou acides peuvent être efficaces pour ce procédé. Par ailleurs, les biomasses algales sont riches en acides gras libres (FFA), qui ne peuvent être convertis en bio-diesel qu'en présence d'un catalyseur acide. Ce bio-diesel peut être utilisé dans les moteurs diesel soit pur soit mélangé avec du gasoil. D'un point de vue environnemental, le bio-diesel comporte plusieurs avantages tels que la réduction des émissions de monoxyde de carbone (50%) et de dioxyde de carbone (78%) (Levine et al., 2010). Il est non toxique et biodégradable et son utilisation, à la place du diesel, réduit la consommation de fossiles combustibles.

Néanmoins, la disponibilité de la matière première de l'huile végétale brute est récemment devenue un problème critique pour la production de bio-diesel (Sheehan et al., 1998). Afin de résoudre cette criticité, les industries utilisent les déchets d'huile ainsi que les graisses végétaux et animales pour produire du bio-diesel. De nos jours, la production de bio-diesel à partir des algues est généralement réalisée par une extraction de leurs contenus en huile suivie d'une étape de transestérification. Les macroalgues sont plus appropriées à la production de biogaz et de bio-éthanol plutôt que de bio-diesel puisqu'elles contiennent des teneurs faibles en triglycérides.

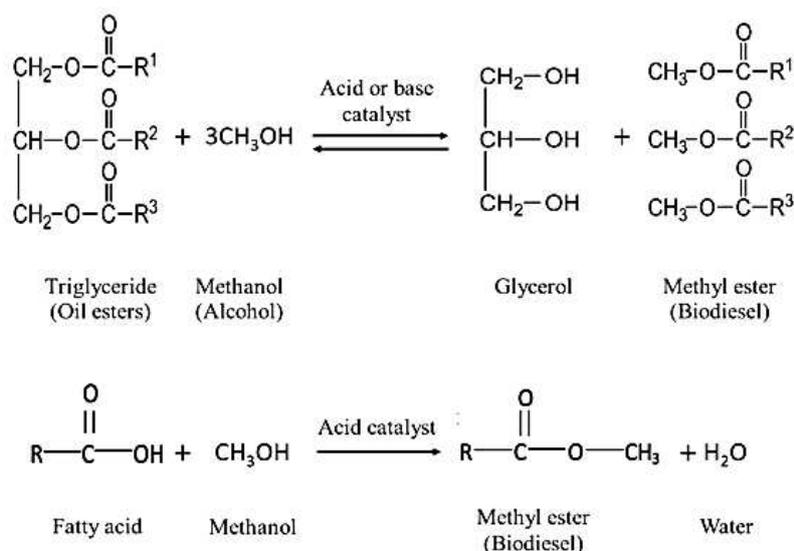


Figure 54. Mécanisme de transestérification et production de bio-diesel à partir des triglycérides et des acides gras (Wibowo et al., 2013).



MATÉRIEL ET MÉTHODES

PARTIE II

Matériel et Méthodes

I. Collecte de la macroalgue

La biomasse d'*H. scoparia* a été collectée en février 2020 aux alentours de la ville de Tabarka, au nord-ouest de la Tunisie (36°57'036.223" N et 8°45'012.018" E) (**Figure 55**). Après la récolte, les thalles ont été rincés avec l'eau distillée pour éliminer les sels, puis séchés pendant 20 jours dans un four à 50°C (Hentati et al., 2020). Les échantillons ont ensuite été broyés en poudre (16 à 40 µm) à l'aide d'une moulinette (Moulinex, France). Cette poudre brute est nommée « RSF ».

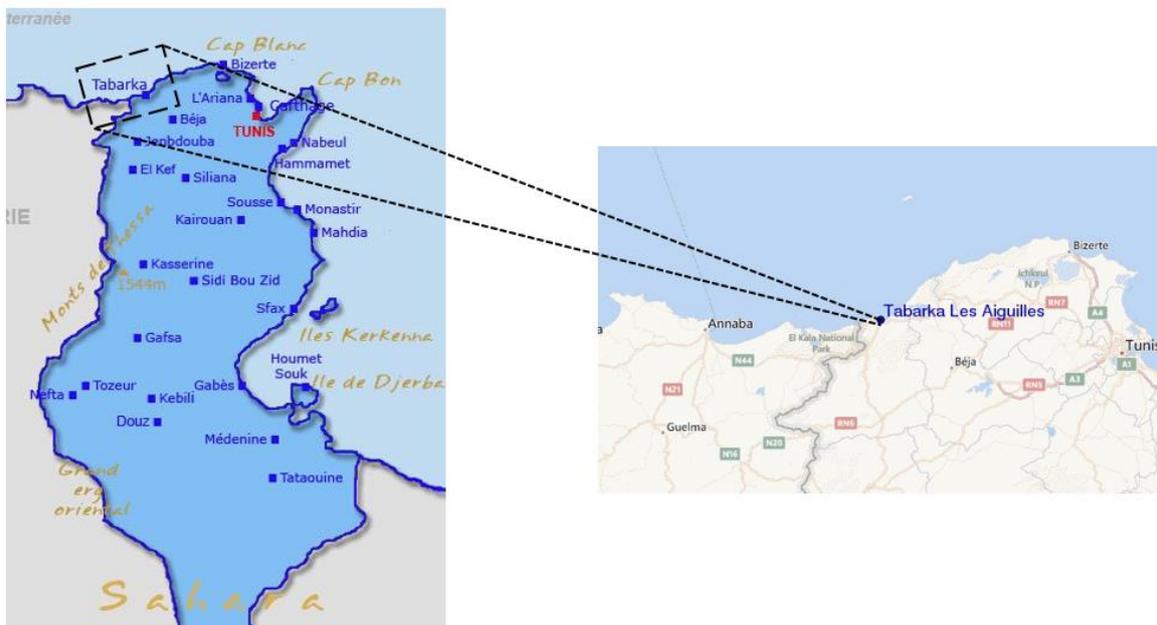


Figure 55. Site d'échantillonnage.

II. Identification moléculaire

II.1 Extraction d'ADN

Deux g de macroalgues fraîches ont été broyées dans de l'azote liquide puis 1 mL de solution de CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) (2% (m/v)) et 40 µL de protéinases K (20 mg/mL) ont été ajoutés. Le mélange a été incubé à 60°C pendant 1 h dans un bain à sec. L'échantillon a été transféré dans des microtubes contenant des billes de silice et soumis à une agitation à l'aide d'un vortex à haute vitesse pendant 5 min afin d'accentuer la lyse cellulaire

par un effet mécanique. Après centrifugation (1 000 g, 30 s, 4°C), 700 µL de surnageant ont été transférés dans un nouveau tube (sans bille de silice) puis 800 µL d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v) ont été ajoutés. Après agitation, suivie d'une centrifugation (12 000 g, 3 min, 4°C), la phase aqueuse (environ 700 µL) a été prélevée et 800 µL d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v) ont été ajoutés. Après centrifugation, la phase aqueuse a été récupérée et 50 µL d'eau ultra pure ont été ajoutés. L'ADN génomique a ensuite été précipité par ajout de 40 µL d'acétate de sodium (3 M, pH 5,3), et deux volumes (900 µL) d'éthanol froid (100%). Après incubation une nuit à -20°C, l'ADN précipité a été culotté par centrifugation (12 000 g, 30 min, 4°C), puis le culot a été lavé par 500 µL d'éthanol (70%) froid. Après centrifugation (12 000 g, 30 min, 4°C), le culot récupéré a été séché à 37°C et dissous dans 40 µL d'eau ultra pure.

II.2. Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

La qualité et l'intégrité de l'ADN extrait ont été testées par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8% (m/v), TAE 0,5x), composé de 2,42 g Tris base, 0,571 mL d'acide acétique (100%) et de 1 mL EDTA (0,5 M), en présence d'un marqueur de poids moléculaire (1 kb DNA ladder, Thermofisher). Après migration, le gel est analysé sous banc UV (Bio rad, Gel doc 2000, USA). L'ADN extrait a été dosé par spectrophotométrie à $\lambda = 260$ nm et la pureté a été évalué par le rapport $Abs_{(\lambda=260)} / ABS_{(\lambda=280)}$.

L'identification moléculaire des macroalgues récoltées a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques déterminées après une étude *in silico* des loci associés à trois marqueurs nucléaires (ADNr 18S, région ITS de l'ADNr, LSUr) et un marqueur chloroplastique (le gène *rbcl*). Les amorces sont présentées dans le **Tableau 1**. Les réactions de PCR ont été réalisées dans un thermocycleur (T100 thermal cycler, Biorad, France) dans un volume réactionnel de 50 µL, composé de 5 µL de tampon 10x (200 mM Tris-HCl (pH 8,8 à 25°C), 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1% (v/v) Triton X-100 et 1 mg/ mL nucléase dépourvue de BSA) 1 µL de dNTP (0,25 mM), 1 µL d'ADN extrait (100 ng), 1 µL d'ADN polymérase Pfu (1U), 1 µL d'amorce reverse (0,5 pmol) et 1 µL d'amorce forward et reverse spécifique pour chaque marqueur. Les amplifications ont été réalisées en suivant le programme suivant : 1/ 95°C pendant 3 min., 58°C pendant 1 min., 2/ 30 cycles 72°C pendant 2 min., 95°C pendant 30 s, 58°C pendant 30 s, 3/ 72°C pendant 5 min.

Tableau 1. Caractéristiques des amorces utilisées

Locus	Région	Type Amorce	Amorces	Sens d'amorce	Séquences	Taille (pb)	Température d'hybridation (°C)
18S	18S		d18S-Fwd	Forward	5'-TGAAGATTCCGGAC(C/T)GTGG -3'	133	58
			d18S-rev	Reverse	5'-GGTAATGATCCTTCCGCAG-3'		
	18S-ITS		d18S-Fwd	Forward	5'-TGAAGATTCCGGAC(C/T)GTGG -3'	259	58
			dITS18-rev	Reverse	5'- TTCGAGCCTTGCAGGCTC-3'		
LSUrDN A	ide Popset	Non dégénérée	hfLSU-Fwd	Forward	5'- AGTAACGGCGAGTGAAGCG-3'	325	60
			hfLSU-rev	Reverse	5'- ATTCAGGCACTCTTTAACTCT -3'		
		Dégénérée	degLSU-Fwd	Forward	5'- AGTAACGG(A/C)GAGTGAAG(G/C)G-3'	325	60
			degLSU-rev	Reverse	5'- ATTCAGGCACTCTTT(A/G)ACTCT -3'		
	MSA		hfLSU-Fwd	Forward	5'- AGTAACGGCGAGTGAAGCG-3'	499	50
			Deg576LSU-rev	Reverse	5'-A(C/T/A)AC(A/G/C)CCA(C/A)GGT(A/C)TTCAC -3'		
	MSA		degLSU-Fwd	Forward	5'-AGTAACGG(A/C)GAGTGAAG(G/C)G-3'	499	50
			Deg576LSU-rev	Reverse	5'- A(C/T/A)AC(A/G/C)CCA(C/A)GGT(A/C)TTCAC -3'		
rBCL	MPOPS ET	Dégénérée	drbcl-Fwd	Forward	5'- TGAGA(C/G/A)TTACACAAGG(A/C)TGTT -3'	341	58
			drbcl-Rev	Reverse	5'-TTACG(C/T)TCTA(G/A)(G/A)TAGAAAC CAGG-3'		

II.3. Clonage des produits de PCR

Après amplification, les produits PCR ont été analysés sur gel d'agarose 1% (m/v), puis clonés dans le plasmide pGEM7Zf (Promega) digéré par *SmaI*. L'étape de ligation des produits de PCR a été réalisée avec 100 ng de pGEM-*SmaI*, dans un volume final de 20 μ L, en présence de 400U de DNA ligase (Promega). Les produits de ligation ont ensuite été introduits par choc thermique (Molecular cloning : a laboratory manual, 1989, Sambrook, Fritsch et Maniatis, University of Texas South Western Medical Center, USA) dans des bactéries compétentes *E. coli* DH5 α (Promega). Les clones bactériens transformés ont été sélectionnés sur boîte de LB-agar composé d'ampicilline (100 μ g/mL), d'IPTG (1 mM) et de X-Gal (0,2 mg/mL). L'extraction de l'ADN plasmidique a été réalisée à partir de clones positifs blancs (clones recombinants) en utilisant le Kit Nucleobond Xtra (Qiagen). Les ADNs extraits ont été obtenus à partir de 150 mL de culture de milieu LB-Ampicilline, préalablement ensemencé avec les clones positifs sélectionnés et incubés une nuit à 37°C sous agitation.

II.4. Séquençage et analyse des séquences

Le séquençage des différents marqueurs clonés a été pris en charge par la société de prestation Eurofins Genomics, à l'aide d'un kit de séquençage taq DyeDeoxy terminator cycle et d'un séquenceur d'ADN 3 700 ABI Prism (Applied Biosystems, Foster City, Californie, USA). Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences disponibles dans GenBank en utilisant le serveur BLAST du site Web du NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Pour montrer les relations phylogénétiques des macroalgues étudiées et des taxons étroitement apparentés, des analyses évolutives ont été menées à l'aide de d'un logiciel moléculaire version 6 (MEGA6). Les arbres phylogénétiques ont été construits à l'aide de la méthode de vraisemblance en utilisant le MEGA X et les valeurs bootstrap sont affichées sur les nœuds en pourcentages de 1000 répétitions.

III. Méthodologie de fractionnement et caractérisation des molécules d'intérêt de la macroalgue *H. scoparia*

La méthodologie de fractionnement des biomolécules de la macroalgue est détaillée dans **figure 56**. L'objectif est d'extraire les PS (alginates et fucoïdanes) et les pigments (β -carotène et fucoxanthine) produits par *H. scoparia* tout en conservant les sous-produits générés pendant les différentes procédures mises en jeu. La fraction brute (algue non raffinée)

sera nommée RPS. Les fractions AHS, FHS, P-FX et P-CT correspondront respectivement aux fractions enrichies en alginates, en fucoïdanes, en fucoxanthines et en β -carotène. Les fractions BP1-PS et BP2-F correspondront aux co-produits générés pendant les procédures d'extraction des PS et de la fucoxanthine, respectivement.

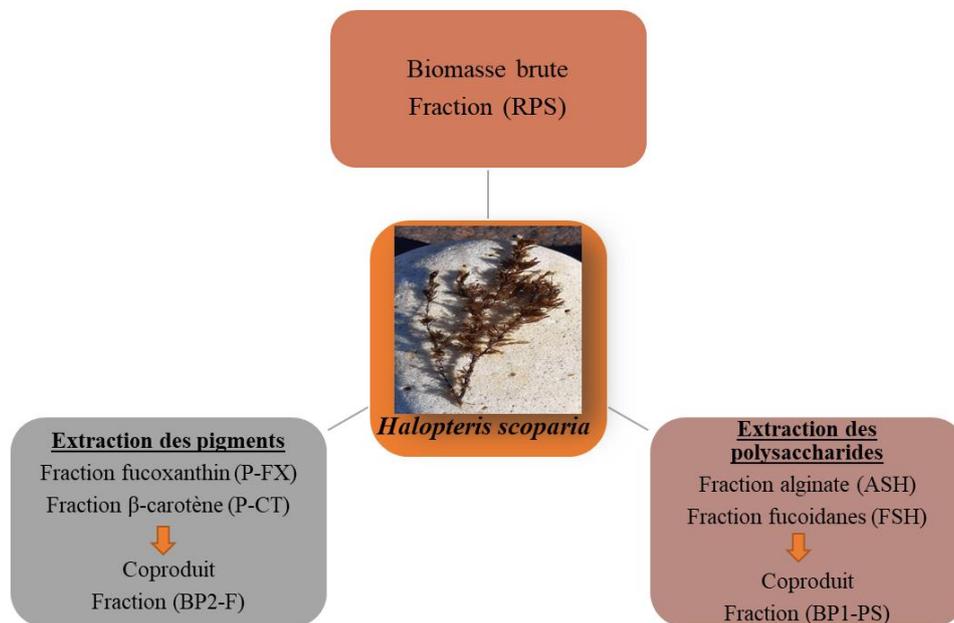


Figure 56. Méthodologie de fractionnement d'*H. scoparia*.

La méthodologie de caractérisation suit la même stratégie, chaque fraction étant analysée selon la composition intrinsèque attendue (Delattre et al., 2016). Les protocoles biochimiques dépendent des attentes structurales pour caractériser chaque fraction, l'accès à une structure fine étant plus important pour les fractions enrichies en alginates (AHS), fucoïdanes (FHS) et fucoxanthines (P-FX). La **figure 57** dresse la synthèse des expérimentations réalisées pour chaque fraction.

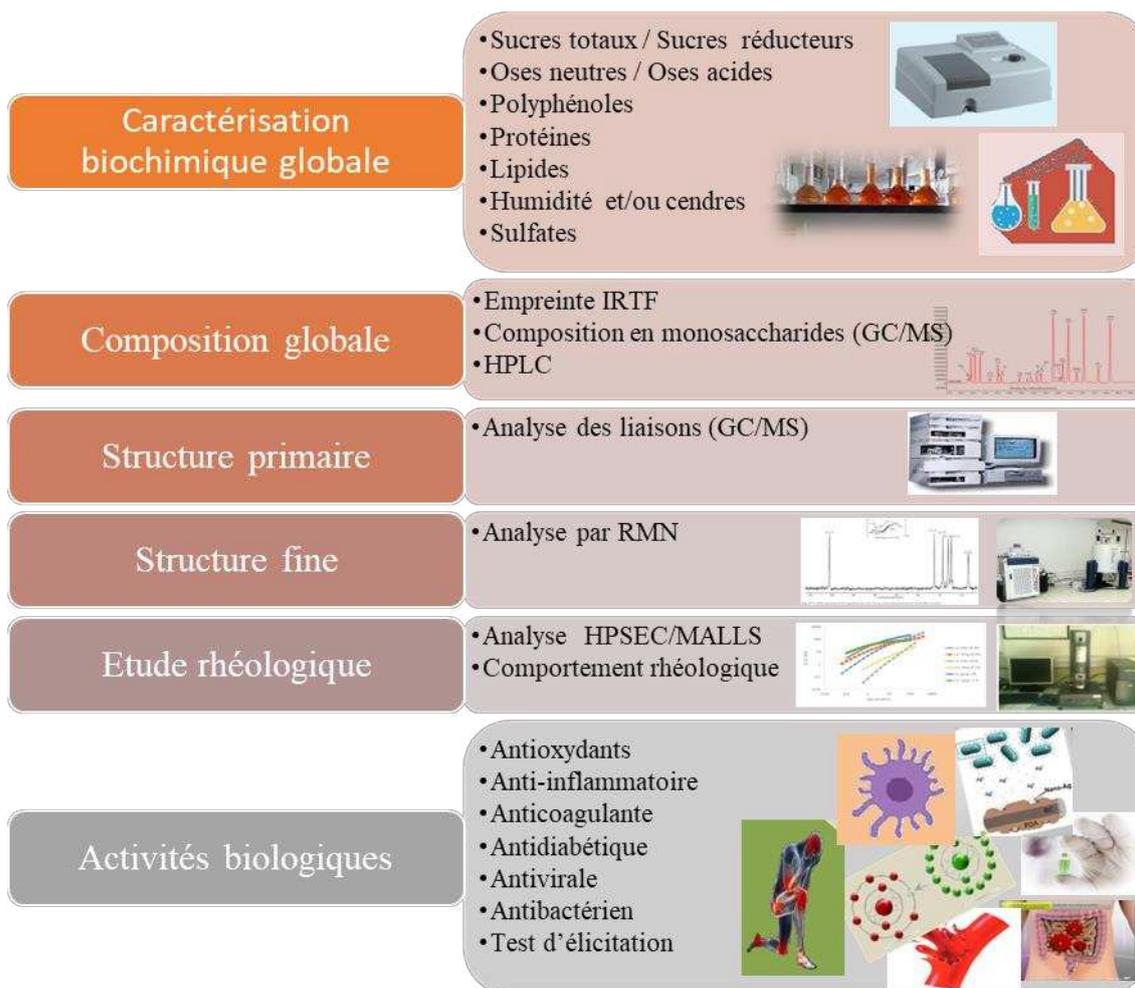


Figure 57. Méthodologie générale de caractérisation des fractions (RPS / AHS / FHS / PFX / PCT / BP1-PS et BP2-PS).

IV. Extraction des molécules d'intérêts étudiées à partir d'*H. scoparia*

IV.1. Extraction des polysaccharides

IV.1.1. Extraction et purification des fucoïdanes d'*H. scoparia* (fraction FHS)

La dépigmentation et la délipidation de 50 g de biomasse d'*H. scoparia* séchée ont été réalisées en utilisant 700 mL d'acétone (deux fois) et 300 mL de méthanol (deux fois) pendant 24 h à la température ambiante sous agitation constante (450 rpm). La poudre dépigmentée et délipidée a ensuite été séché au four à 50 °C pendant 24 h. La **figure 58** montre l'extraction et la purification des fucoïdanes qui ont été réalisées selon un protocole adapté de Ermakova et al. (2013). Vingt-cinq g de la macroalgue délipidés et séchés ont été traités avec 500 mL une

solution aqueuse de HCl (0,1 M) durant 2 h à 60 °C sous agitation continue (450 tr/min). Le surnageant a été recueilli après filtration sur un verre fritté de porosité 3 (16–40 µm) et des centrifugations successives (5 000 x g, 10 min, 20 °C). Le mélange est soumis ensuite à plusieurs cycles (3) de précipitations alcooliques (éthanol absolu, -20°C, 3/1 v/v) et de centrifugations (8 000 x g, 10 min, 4°C) afin de purifier le précipité enrichi en PS. Finalement, ce dernier a été dissous dans de l'eau ultrapure (30 g/L). La solution a été dialysée à l'aide des boudins de dialyse (Snakeskin, 3,5 kDa MWCO, 35 mm sec Martini I.D) contre l'eau ultrapure durant 3 jours avec changement régulier du milieu et suivi de la conductivité. La solution dessalée a été enfin lyophilisée et nommée « FHS » correspondant à la fraction enrichie en fucoïdanes extraits d'*H. scoparia* « FHS ».

IV.1.2. Extraction et purification des alginates à partir d'*H. scoparia* (fraction AHS)

Les alginates de sodium d'*H. scoparia* ont été isolés à l'aide d'une extraction basée sur le protocole adapté de Davis et al. (2004) (**Figure 58**). Vingt-cinq g de la biomasse algale préalablement délipidés, dépigmentés et traités deux fois avec une solution de HCl (500 mL, 0,1 M, pH = 2) ont été lavés avec l'eau ultrapure puis traités par un ajout de 500 mL de Na₂CO₃ (3% (m/v), pH = 11), laissés sous agitation constante (450 tr/min) à 60 °C pendant 2 h afin de solubiliser les alginates sous une forme de sels de sodium. Après centrifugation (10 000 x g, 15 min, 4°C), le surnageant recueilli a été précipité par 3 volumes d'éthanol absolu et à froid (-20 °C) pendant 15 min. Le précipité obtenu a été récupéré par centrifugation (12 000 x g, 30 min, 4 °C), solubilisé dans 300 mL d'eau ultrapure puis acidifié par un ajout de HCl (6 M) afin de favoriser la précipitation de l'acide alginique à un pH compris entre 1,5 et 3. Après des centrifugations successives (5 000 g, 20 min, 4°C), le culot formé a été dissout dans 200 mL d'eau ultrapure et neutralisé (pH = 7,5) à l'aide d'une solution de NaOH (1 M). L'alginate de sodium a de nouveau été précipité par 3V d'éthanol absolu froid à -20 °C pendant 15 min, puis le mélange a été centrifugé (12 000 x g, 30 min, 4 °C). Le culot de PS, constitue la fraction enrichie en alginates de sodium nommée « AHS ». Il a été solubilisé dans de l'eau ultrapure à une concentration de (50 g/L) avant d'être lyophilisé.

Les co-produits générés par la procédure d'extraction et de purification des sections I.4.1.1. et I.4.1.2. viennent former la fraction « BP1-PS ».

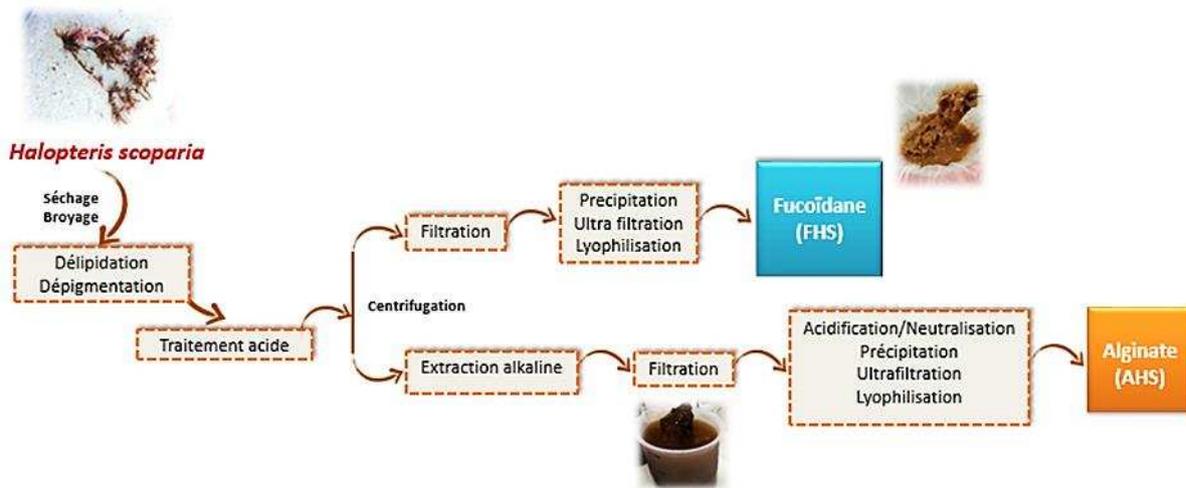


Figure 58. Procédure d'extraction des fucoïdanes et des alginates à partir de la macroalgue brune *H. scoparia*.

IV.2. Extraction des pigments

IV.2.1. Extraction des carotenoides à partir d'*H. scoparia*

La biomasse d'*H. scoparia* a été mélangé avec du méthanol pur (50% m/v) et maintenu sous agitation (250 tr/min) pendant 48 h, dans l'obscurité et à la température ambiante afin de limiter les phénomènes d'oxydation. Chaque extrait a été filtré à l'aide d'un papier Wattman n° 1 pour éliminer les particules. L'opération a été répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une poudre d'algues incolore. Tous les extraits ont ensuite été mélangés pour former une fraction unique d'extrait brut, qui a été séchée à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40 °C et à 337 mbar (BUCHI, Recirculating Chiller F-100). Une solution d'hexane et d'eau distillée a été ajoutée (1:1) (v:v) à la fraction brute puis le mélange a été agité. La couche supérieure, correspondant à l'hexane enrichi en pigments solubles, a été recueillie. Du chloroforme a ensuite été ajouté à l'extrait d'hexane (1:0,5) (v:v). Le mélange formé a été centrifugé (5 000 x g, 15 min, température ambiante). La couche organique a été conservée et séchée à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C et 337 mbar (BUCHI, Recirculating Chiller F-100). L'extrait a enfin été lyophilisé afin d'éliminer toutes traces résiduelles de chloroforme (Kawee-Ai et al., 2019) (**Figure 59**).

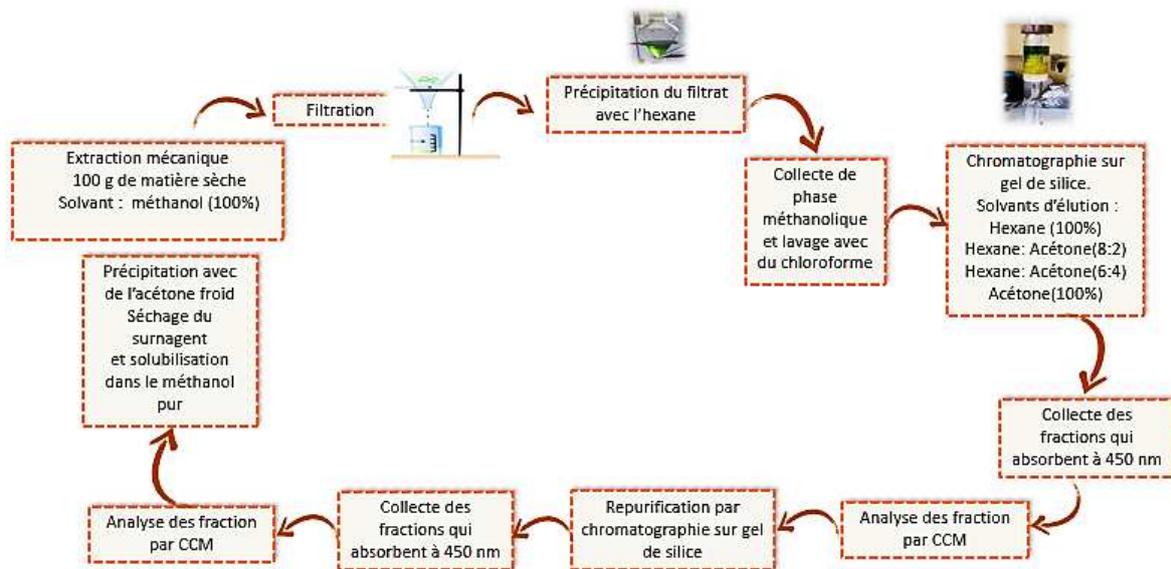


Figure 59. Procédures d'extraction et de purification des caroténoïdes d'*H. scoparia*.

IV.2.2. Purification des fucoxanthine (fraction P-FX)

IV.2.2.1. Chromatographie sur colonne de silice

Pour la séparation et la purification des fucoxanthines (P-FX), une colonne en verre de dimension (30 cm x 25 mm) a été nettoyée avec de l'acétone et bouchée par du coton au niveau de leur extrémité inférieure. Après agitation continue de silice (230-400 mesh) dans du n-hexane, le gel formé a été placé directement dans la colonne (après dégazage). La colonne a été laissée au repos pendant un jour afin de stabiliser le gel de la silice. L'échantillon lyophilisé (Section I.4.2.1.) a été dissous dans du méthanol pur, puis 5 mL ont été déposés au niveau de la colonne. L'éluion a été effectuée en utilisant des solvants de polarité croissante. La première éluion a été effectuée avec 200 mL d'hexane pur comme phase mobile, la deuxième en utilisant environ 200 mL d'un mélange de n-hexane/acétone (8:2, v:v) afin d'éliminer les chlorophylles, la troisième par environ 300 mL d'un mélange n-hexane/acétone (6:4, v:v) afin d'éluer principalement la fucoxanthine (P-FX) (et une partie des β -carotènes, et la quatrième par 400 mL d'acétone afin d'éliminer toutes les impuretés de la colonne. Pour chaque fraction collectée, l'absorbance a été mesurée à $\lambda = 450$ nm avec un spectrophotomètre UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys50, USA). Les fractions ayant des valeurs d'absorbance élevées ont été recueillies et séchées à l'aide d'un évaporateur rotatif (40°C, 360 mbar), puis lyophilisées. Ces extraits ont ensuite été réintroduit dans la colonne de silice et le même protocole de purification a été suivi afin d'améliorer leur pureté. Finalement, un dernier

échantillon enrichi en fucoxanthine (P-FX) a été séché à l'aide d'un évaporateur rotatif (40°C, 360 mbar) puis lyophilisé (Wang et al., 2014).

IV.2.2.2. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince a été utilisée pour séparer et vérifier la pureté des pigments biologiques en fonction de leur affinité différentielle sur une plaque de silice, représentant la phase stationnaire, à l'aide de plaques TLC (10 x 5 cm, 0,2 mm d'épaisseur, Merck, Darmstadt, Allemagne). Les pigments sont séparés en fonction des variations de leurs solubilités. Ainsi, les pigments à haute polarité s'adsorberont à la plaque de silice et les pigments à faible polarité migreront vers plus loin sur les plaques de silice (Jaswir et al., 2013).

Cinq µL de P-FX ont été déposés sur la plaque de silice et laissés sécher pendant quelques minutes. La plaque a été introduite dans une cuve en verre remplie à hauteur de 1 cm par un solvant d'élution composé de n-hexane et d'acétone (6:4, v:v). Après 30 min de migration à température ambiante, la plaque a été séchée à l'air libre et des bandes colorées ont été observées. Les valeurs des rapports frontaux Rf des pigments photosynthétiques tels que les chlorophylles, les caroténoïdes et les P-FX extraits ont été calculés en utilisant l'**Equation 3** :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le pigment}}{\text{Distance parcourue par le solvant}} \quad (\text{Eq 3})$$

IV.2.3. Purification du β-carotène (fraction P-CT)

IV.2.3.1. Chromatographie sur colonne

La purification des β-carotènes (P-CT) par chromatographie sur colonne a été réalisée en utilisant les mêmes conditions que celles décrites en Section I.4.2.2.1. En effet, le β-carotène (P-CT) a été élué avec le gradient hexane/ acétone (6 :4) (même gradient que le P-FX) mais ce pigment a été purifié d'avantage et récupéré après réalisation d'une chromatographie sur couche mince (I.4.2.2.2.).

IV.2.3.2. Chromatographie sur couche mince

La fraction enrichie en β-carotènes (P-CT) a été éluée dans un système identique à celui décrit en section I.4.2.2.2., en utilisant le mélange n-hexane/acétone (8:2, v:v) comme phase mobile. Les bandes du β-carotène (P-CT) ont été identifiées par comparaison du profil de migration avec un standard commercialisé (β-carotène, Sigma Aldrich). Les bandes ont été

grattées puis dissoutes dans de l'éther de pétrole. Après centrifugation, le surnageant récupéré a subi également une deuxième migration. Le processus a été répété jusqu'à l'obtention d'une seule bande sur la plaque de silice. La valeur du rapport frontale (Rf) a été calculée en utilisant l'Equation 3.

V. Caractérisation biochimique générale de la macroalgue (fraction brute RPS) et des co-produits générés pendant les extractions des polysaccharides et des pigments (BP1-PS et BP2-F)

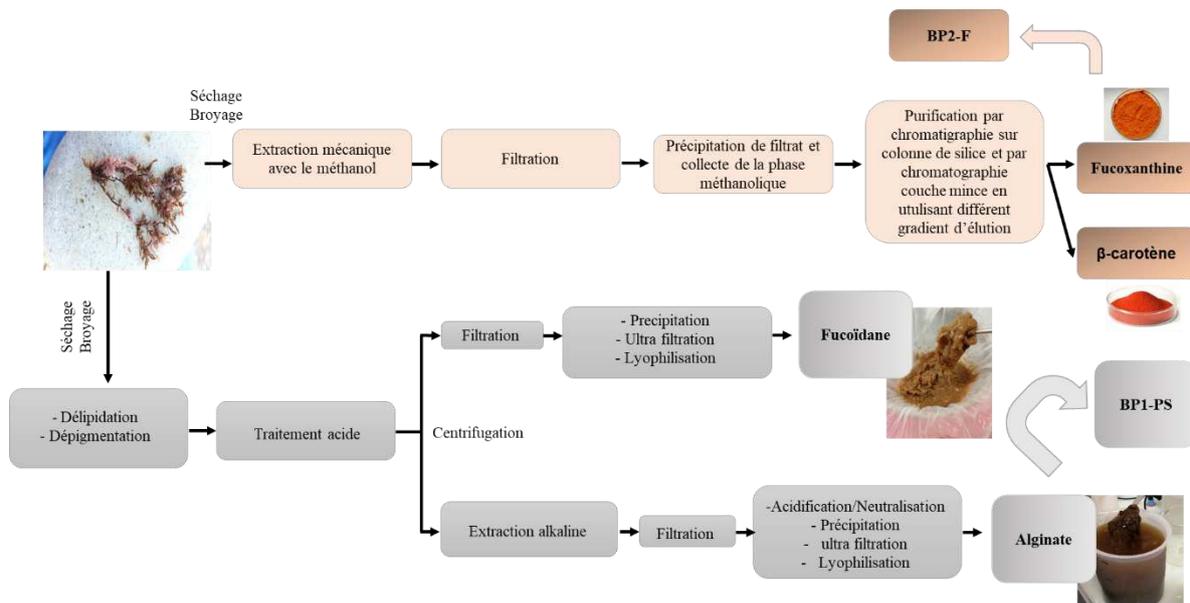


Figure 60. Extraction des pigments et des polysaccharides à partir de RPS et formation des co-produits BP1-PS et BP2-F.

V.1. Extraction des carbohydrates totaux

La même technique gravimétrique non enzymatique (méthode officielle AOAC 993.21) a été utilisée pour déterminer les teneurs des polysaccharidiques totaux dans la biomasse de la macroalgue totale « RPS » et dans les fractions obtenues après extraction des PS et des pigments, « BP1-PS » et « BP2-F », respectivement (voir Section I.4) (Barkallah et al., 2017 ; Chakou et al., 2021) (**Figure 60**). Cent mg de RPS et BP1-PS ont été dépigmentés avec 1 400 mL d'acétone puis délipidés avec 600 mL de méthanol pendant 14 h à température ambiante sous agitation modérée (500 rpm). Les suspensions obtenues ont été filtrées à l'aide d'un tamis à mailles fines d'une porosité de 16 à 40 μm . RPS, BP1-PS et BP2-F préalablement dépigmentés et délipidés ont été dissouts dans 100 mL de l'eau ultrapure pendant 4 h à 80°C sous agitation (400 rpm). Ensuite, 300 mL d'éthanol (97%, -20 °C) ont été ajoutés à chaque

fraction afin de précipiter les PS. Les précipités obtenus ont été centrifugés ($20\,000 \times g$, 20 min, 4°C) et les culots ont été récupérés. Ces cycles de précipitation/centrifugation ont été répétés trois fois. Enfin, les PS ont été mis en suspension dans de l'eau ultrapure (50 g/L) et lyophilisés. Les teneurs en glucides totaux et en sucres réducteurs ont été déterminées par la technique colorimétrique de Dubois (Dubois et al., 1956) et celle à l'acide bicinchoninique, respectivement (Waffenschmidt et al., 1987). Le glucose a été utilisé dans chaque procédure comme standard.

V.1.1. Dosage des sucres totaux

La concentration totale en sucres totaux des fractions a été déterminée par une méthode adaptée de Dubois et al. (1956). Brièvement, 500 μL de chaque échantillon (ou des solutions composant la gamme de glucose) ont été ajoutés à 500 μL de phénol (50 g/L). Un volume de 2,5 mL d'acide sulfurique concentré (97%) a ensuite été introduit dans le mélange. Après incubation 10 min à température ambiante et homogénéisation (10 s, 300 rpm), les tubes ont de nouveau été incubés pendant 15 min à température ambiante puis 30 min à 35°C dans un bain marie avant lecture de l'absorbance à $\lambda = 483\text{ nm}$ (Spectrophotomètre Thermo Scientific Biomate-160, USA).

V.1.2. Dosage des sucres réducteurs

Les concentrations en sucres réducteurs ont été mesurés selon la méthode à l'acide bicinchoninique (Waffenschmidt et al., 1987 ; Doner et al., 1992) avec de légères modifications. Après préparation des deux solutions de travail A et B, composées, respectivement, de 12,7 g de bicarbonate de sodium (NaHCO_3), 4,84 g de carbonate de sodium (Na_2CO_3), et 0,34 g de 2,20 biquinoléine dissout dans 200 mL d'eau distillée ; et 0,25 g de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) avec 0,25 g de L-sérine dissous dans 200 mL d'eau distillée ; 0,2 mL d'extraits de PS (0,2 g/L) ont été ajoutés à 0,8 mL d'eau distillée et à 0,5 mL de solutions A/B (v/v). Après incubation pendant 15 min à 100°C (bain marie), la teneur en sucres réducteurs a été quantifiée à $\lambda = 540\text{ nm}$ en utilisant le D-glucose comme standard (Spectrophotomètre Thermo Scientific Biomate-160, USA).

V.1.3. Dosage des composés phénoliques

Une méthode par ultrason a été utilisée pour extraire et quantifier les composés phénoliques des fractions RPS, BP1-PS et BP2-F. En effet, 10 g de la biomasse macroalgale séchée ont été mélangés avec 200 mL d'acétone (80% (v/v)) et incubés pendant 45 min à 4°C ,

120 W et 40 KHz. La suspension a été centrifugée ($5\,000 \times g$, 10 min, 4°C), et le surnageant a été récupéré et séché à l'aide d'un évaporateur rotatif (Stuart RE300B, Stone, UK) à la température ambiante et 70 mbar (Kumar et al., 2020). La teneur totale en phénols a été déterminée selon la technique de Folin-Ciocalteu, établie par Singleton et al. (1965) en utilisant l'acide gallique comme étalon (Singleton et al., 1965). Brièvement, 200 μ L de l'extrait ont été introduits dans un tube à essai et mélangés avec 1,5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu (10%, m/v) et 1,5 mL de carbonate de sodium (6%, m/v) avant d'être incubés pendant 30 min à température ambiante. Puis, l'absorbance a été mesurée à $\lambda = 760$ nm (Spectrophotomètre Thermo Scientific Biomate-160, USA) (Naghraoui., 2012).

V.2. Extraction des lipides

La méthode de Soxhlet a été utilisée pour déterminer la teneur en matière grasse des échantillons sec RPS, BP1-PS et BP2-F. Cinq cents mg de chacune des fractions ont été insérés dans une cartouche en cellulose dans l'appareil Soxhlet. Au-dessus de l'appareil soxhlet, un réfrigérant a été placé, et en dessous un ballon. Au préalable, le ballon a été pesé à vide. Nous avons y placé 170 mL d'hexane. Après un chauffage à 60°C pendant 4 h à l'aide d'un chauffe ballon, l'hexane va s'évaporer et se condenser dans le système réfrigérant. Ensuite, l'hexane condensé va passer dans le soxhlet et solubiliser les lipides qui se trouvent dans l'extrait placé dans la cartouche de cellulose. Une fois que l'hexane arrivera au niveau du haut du siphon, une distillation va se produire pendant 40 min (tout l'hexane contenant des lipides va retourner dans le ballon) (**Figure 61**). A la fin de la réaction, l'hexane a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif pendant 30 min à 55 °C et 69 mbar (Stuart RE300B, Bibby Scientifics, Stone, UK). Le résidu a été placé ensuite dans une étuve afin de sécher la fraction enrichie en lipides. La différence de masse du ballon avant et après extraction donnera la masse de lipides, et à partir de la masse de l'échantillon il est possible donc de déterminer la teneur en lipides au niveau de l'échantillon (**Equation 4**).

$$\text{Teneur en lipide} = \frac{(\text{Masse du ballon avec lipide} - \text{Masse du ballon vide})}{\text{Masse de l'échantillon}} \quad (\text{Eq 4})$$

- (1) 170 mL d'hexane
- (2) Ballon de 250 mL en pyrex
- (3) Retour de distillation
- (4) Corps de l'appareil
- (5) Cartouche en cellulose
- (6) Haut de siphon
- (7) Sortie du siphon
- (8) Adaptateur d'expansion
- (9) Condenseur
- (10) Entré de flue d'eau
- (11) Sortie de l'eau

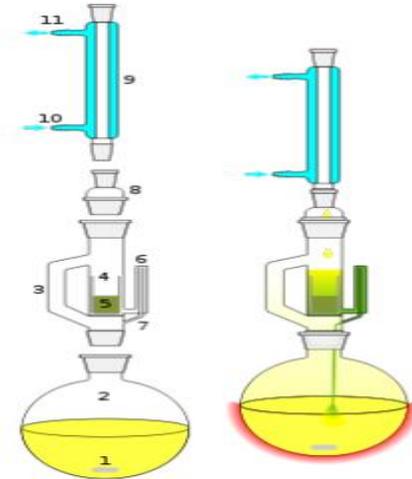


Figure 61. Schéma de l'extraction des lipides par soxhlet.

V.3. Détermination de la teneur en humidité

Le teneur en humidité des fractions RPS, BP1-PS et BP2-F a été mesurée par la technique d'AOAC (AOAC, 2000). 0,5 g de chaque échantillon ont été placés dans un creuset et séché dans une étuve à flux à 105°C pendant 24 h. Les échantillons sont ensuite immédiatement placés dans un dessiccateur avant d'être pesés après leur retour à température ambiante. La différence entre les masses des échantillons après séchage et avant séchage définit la quantité d'eau évaporée selon l'**Equation 5** :

$$\% \text{ d'humidité} = \frac{(100 - (\text{Creuset avec matière séchée} - \text{Creuset vide}))}{\text{Masse de l'échantillon}} \times 100 \quad (\text{Eq 5})$$

V.4. Détermination de taux de cendres brutes

La teneur en cendres a été déterminée après incinération. Cinquante mg de RPS, BP1-PS et BP2-F ont été introduits dans des creusets et incinérés pendant 4 h à 550°C. La teneur en cendres a été calculée en utilisant l'**Equation 6** :

$$\% \text{ cendre} = \frac{(100 - (\text{Creuset avec matière séchée} - \text{Creuset vide}))}{\text{Masse de l'échantillon}} \times 100 \quad (\text{Eq 6})$$

V.5. Dosage des éléments minéraux

La composition en éléments minéraux a été déterminée après incinération des biomasses RPS, BP1-PS et BP2-F à 550°C pendant 6 h. Un g de cendres obtenues a été minéralisé par l'ajout de 2,5 mL d'HCl (37% (v/v)) et 2,5 mL d'acide nitrique (2 M) et à chaud (120°C). Le minéralisât obtenu a été, par la suite, filtré, dilué dans 50 mL d'eau ultrapure, puis analysé à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique (iCETM3300, Thermo Scientific, Waltham, MA, États-Unis) (Elleuch et al., 2021).

V.6. Dosage des protéines

La teneur en protéines des fractions RPS, BP1-PS et BP2-F a été quantifiée en suivant la méthode de Kjeldahl, *via* l'utilisation d'un facteur de conversion de l'azote de 6,25, selon la méthode AOAC International, 981.10 (Mæhre et al., 2018). Brièvement, 0,5 g de chaque fraction est introduit dans un matras à minéralisation, en présence d'1 g de catalyseur (sulfate de potassium et sulfate de cuivre (m:m)), puis 10 mL d'acide sulfurique concentré (97%) ont été lentement ajoutés sous agitation douce. Le matras est ensuite placé sur la rampe de minéralisation, chauffé jusqu'à disparition des mousses puis porté à ébullition douce pendant 4 h. Après refroidissement du matras, le NH₃ formé est entraîné par la vapeur d'eau pendant 5 min à l'aide d'un dispositif de distillation. Après distillation, une titration à l'aide d'une solution de NaOH 0,1M en présence d'un indicateur coloré (indicateur de Tashiro) est réalisée. Le point d'équivalence est repéré par le changement de coloration de l'indicateur du bleu vers le jaune. La teneur en protéines brutes du produit est obtenue selon l'**Equation 7** :

$$\text{Teneur en protéines} = \frac{14 \times V \times 10^{-3} \times 0,1}{M} \times 100 \times 6,25 \quad (\text{Eq 7})$$

Avec 14 : Constante d'azote ; 6,25 : Facteur empirique des protéines dosé par kjeldhal ; M : masse de l'échantillon : prise d'essai = 0,5 g ; 0,1 : concentration de l'acide sulfurique lors de titrage ; V = volume ajouté lors de la titration.

VI. Caractérisation biochimique et structurale des fractions enrichies en fucoïdanes (FHS) et en alginates de sodium (AHS)

VI.1. Dosages colorimétriques

VI.1.1. Dosage des sucres totaux

Ce dosage met en jeu une déshydratation à chaud des hexoses et des pentoses sous l'action de l'acide sulfurique H_2SO_4 (97%) induisant la formation de composés furfuriques et de dérivés 5-hydroxyméthylfurfural après une étape de cyclisation, réagissant par la suite avec le phénol (5%, m/v) en donnant une coloration jaune-rouge. Brièvement, 1 mL de la fraction testée (10 g/L ou diluée) est ajouté dans un tube en verre préalablement placé dans un bac de glace. Un mL de phénol (5%, m/v) et 5 mL d' H_2SO_4 (97%) sont ajoutés avec précaution à la solution, le mélange étant ensuite vortexé. Après incubation pendant 30 min à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à $\lambda = 485$ nm (Dubois et al., 1956). Le D-glucose a été utilisé comme standard. Accessoirement, le D-fucose et l'acide D-glucuronique ont également été utilisés pour réaliser les gammes de calibration, en raison des caractères structuraux des deux fractions (fucoïdane riche en fucose et alginate riche en acide uronique).

VI.1.2. Dosage des oses neutres et acides

VI.1.2.1. Oses neutres

Les sucres neutres ont été déterminés par la méthode à l'orcinol sulfurique (Monsigny et al., 1988) en utilisant le D-glucose comme standard de calibration. Brièvement, 200 μL d'échantillon sont ajoutés à 1 mL d' H_2SO_4 80% (v/v) puis 200 μL de résorcinol (6 mg/mL). Après agitation, les échantillons ont été incubés pendant 30 min au bain-marie à 90°C. L'apparition d'une coloration jaune-brun correspond à la réaction des dérivés furfuraux libérés en milieu acide et à chaud avec le résorcinol. Après refroidissement des échantillons pendant 30 min à l'abri de la lumière, 1,4 mL d'eau ultrapure ont été ajoutés dans chaque tube puis l'absorbance a été mesurée à $\lambda = 450$ nm (Spectrophotomètre JASCO V-730, Japon).

VI.1.2.2. Acides uroniques

Les acides uroniques des fractions FHS et AHS ont été quantifiés en utilisant la procédure décrite par Blumenkrantz et Asboe-Hansen (Blumenkrantz et al., 1973), en utilisant l'acide D-glucuronique comme standard. La formation de dérivés d'acide 5-formylfuroïque

donne naissance à des chromophores de couleur rose en présence de méta-hydroxydiphényl. Notons que la coloration obtenue est sensible aux interférences dues à la présence éventuelles d'oses neutres. Brièvement, 200 μL d'échantillon ont été mélangés à 1 mL d'une solution de tétraborate de sodium 0,12 M puis vortexés. Les échantillons ont ensuite été placés 1 h au bain-marie à 90°C. Immédiatement après la sortie du bain-marie, 200 μL d'une solution de m-HBP (100 mg/mL) ont été ajoutés puis la solution a été mélangée avant d'être incubée pendant 2 min au bain marie à 90°C. Après refroidissement, l'absorbance de la solution a été mesurée à $\lambda = 520 \text{ nm}$ (Spectrophotomètre JASCO V-730, Japon).

La méthode de correction de Montreuil et Spike (1963) a été utilisée afin d'éliminer les interférences dues à la présence éventuelle d'oses neutres au cours du dosage des acides uroniques. Les concentrations en oses neutres (ON) et oses acides (OA) ont été calculées en utilisant les **Equations 8-11** :

$$\text{DO résorcinol} = \alpha [\text{ON}] + \beta [\text{OA}] \quad (\text{Eq 8})$$

$$\text{DO mHBP} = \alpha' [\text{ON}] + \beta' [\text{OA}] \approx \beta' [\text{OA}] \quad (\text{ON est négligeable (Eq 9)})$$

$$[\text{OA}] = \frac{\text{DO m-HBP}}{\beta'} \quad (\text{Eq 10})$$

$$[\text{ON}] = \frac{[\text{DO résorcinol} - (\beta \times \frac{\text{DO m-HBP}}{\beta'})]}{\alpha} \quad (\text{Eq 11})$$

Avec α : coefficient directeur de la gamme étalon d'ON obtenu par dosage au résorcinol, β : coefficient directeur de la gamme étalon d'OA obtenu par dosage au résorcinol, β' : coefficient directeur de la gamme étalon d'OA obtenu par dosage au m-HBP et α' : coefficient directeur de la gamme étalon d'ON obtenu par dosage au m-HBP.

VI.1.3. Dosage des protéines

Selon la méthode de Bradford (Bradford et al., 1976) (méthode Coomassie Brilliant Blue G-250), la concentration en protéines des fractions a été déterminée en utilisant de l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard. Brièvement, 800 μL de l'échantillon (2 g/L ou dilué) sont ajoutés à 200 μL de réactif de Bradford, puis agités. Après 30 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à $\lambda = 595 \text{ nm}$ (Spectrophotomètre JASCO V-730, Japon). La BSA a été utilisée comme standard.

VI.1.4. Dosage des groupements sulfates

La concentration en groupements sulfate des fractions a été mesurée selon la méthode turbidimétrique (BaCl₂/gélatine) décrite par Dodgson et al. (1962). Brièvement, cent vingt mg d'échantillons ont été hydrolysés pendant 2 h à 100°C après l'ajout de 3 mL d'une solution de HCl (2 M). Le mélange a ensuite été centrifugé (13 000 x g, 30 min, 25°C) et 1 mL du surnageant a été récupéré. Neuf mL d'eau ultrapure ont été ajoutés au 1 mL ainsi que 1 mL d'une solution aqueuse de HCl (0,5 M) et 0,5 mL du réactif BaCl₂/gélatine fraîchement préparé (150 mg de gélatine ont été mélangés à 50 mL d'eau ultrapure à 70°C, puis laissés à 4°C pendant 16 h, puis une masse de 0,5 g de BaCl₂, 2H₂O a été finalement ajoutée à la solution, le mélange étant vortexé jusqu'à solubilisation complète). L'absorbance des échantillons a été mesurée à $\lambda = 535$ nm (Spectrophotomètre JASCO V-730, Japon). Une gamme étalon de sulfate de potassium (K₂SO₄) a été utilisé.

VI.1.5. Dosage des composés phénoliques

La teneur totale en composés phénoliques a été quantifiée par la méthode de Folin-Ciocalteu en utilisant l'acide gallique comme standard (Singleton et al., 1965). Brièvement, 0,5 mL de l'échantillon testé est additionné à 10 mL d'eau ultrapure et 0,5 mL de Folin-Ciocalteu (2 N, Sigma-Aldrich, USA). Après 3 min, 1 mL d'une solution aqueuse de Na₂CO₃ (35%, m/v) a été ajouté. Après 1 h d'incubation, l'absorbance de l'échantillon a été mesurée à $\lambda = 750$ nm (Spectrophotomètre JASCO V-730, Japon).

VI.2. Caractérisation structurale des fractions FHS et AHS

VI.2.1. Analyse par spectroscopie infrarouge (empreintes)

Des mesures (empreintes) par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) ont été effectuées à l'aide d'un instrument VERTEX 70 FT-IR équipé d'un module ATR A225 (palladium-diamant). Le rayonnement infrarouge absorbé par le PS est exprimé en fonction des longueurs d'ondes bien spécifique dans l'intervalle de 4000 à 400 cm⁻¹ caractéristique de la nature et de la conformation du PS et de ses liaisons constitutives. Les spectres obtenus constituent une empreinte chimique utiles à une pré-identification des familles de PS étudiées (Benaoun et al., 2017).

Les spectres IR (50 scans) ont été obtenus à température ambiante (blanc : air, atmosphère contrôlé, 20 scans) dans la plage spectrale 4000-400 cm⁻¹, après correction du bruit de fond, des rapports H₂O/O₂/CO₂ et lissage (niveau 13) à l'aide de logiciel OPUS 7.2

(Bruker Optik GmbH, package 3D, CHROM, IR et PRO). Les spectres ont été analysés à l'aide du même logiciel et les résultats exportés pour tracés à l'aide du logiciel Origin 8.5.1. SR2 (OriginLab).

VI.2.2. Composition en monosaccharides

VI.2.2.1. Dépolymérisation des polysaccharides

Brièvement, 15 mg de PS ont été hydrolysés dans 1,5 mL d'une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique 2 M (TFA) pendant 90 min à 120°C et sous agitation (1200 rpm).

Concernant les analyses par chromatographie ionique (Section I.6.2.2.2.), les produits obtenus ont été neutralisés par une solution d'ammoniac 35% et centrifugés à 14 000 x g durant 15 min. Des dilutions en cascade de l'ordre de 1/10, 1/100 et 1/1000 ont été préparés à partir de la solution mère 10 mg/mL. Les surnagent obtenus ont été filtrés sur un filtre de 0,22 µm avant injection.

Concernant les analyses par chromatographie phase gaz (Section I.6.2.2.3.), les hydrolysats obtenus ont été évaporés à sec sous flux d'azote (Stuart, Block Heater SBH 200D/3 et Concentrator SBH CONC/1) à 60°C pendant 20 à 25 min. Un mL de méthanol a été ajouté aux résidus secs, puis les suspensions ont été mélangées jusqu'à obtention d'une solution, puis évaporées à sec dans les mêmes conditions que précédemment. Cette étape a été répétée 2 fois afin d'éliminer les traces résiduelles d'acide.

VI.2.2.2. Analyse des monosaccharides par chromatographie ionique couplée à l'ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD)

La chromatographie est couplée à un détecteur ampérométrique pulsé (DAP) consiste en l'identification et la quantification des monosaccharides constitutifs des extraits de PS à analyser. La séparation a été réalisé dans des conditions alcalines permettant l'ionisation des groupements OH des oses et la formation des oxyanions (R-O⁻). Après hydrolyse acide les monosaccharides obtenus ont été transformés dans la phase mobile en alcoolates à des pH plus grands que le pKa de leurs groupements hydroxyles (-OH → -O⁻). En effet, Lorsque les monomères ont été élués de la colonne, ils ont subi une oxydation de leur groupement hydroxyle à la surface d'une électrode en or. Cette oxydation produit un courant électrique qui est proportionnel à la concentration en analytes, ce qui prouve que l'analyse par CEAHP-DAP est quantitative. Le potentiel appliqué à l'électrode forme des produits d'oxydation qui endommage sa surface. Donc, afin de prévenir la diminution du signal, la

surface de l'électrode est continuellement nettoyée. La gamme d'étalons externes et internes dans l'échantillon permet de donner une estimation qualitativement et quantitativement de la composition monomérique des hydrolysats de PS.

Tout d'abord, la colonne de chromatographique a été équilibré en utilisant NaOH (18 Mm) durant 15 min. Ensuite, les échantillons sont analysés par CEAHP et un volume de 25 μ L a été injectés sur les colonnes thermostatées à 25°C et à un débit d'éluant de 1 mL/min. Les échantillons injectés ont été élués avec un gradient isocratique pendant 30 min en utilisant le NaOH (18 mM), suivi par une élution des acides uroniques en utilisant un gradient linéaire d'acétate de sodium dissout dans le NaOH (200 mM) pendant 20 min suivi d'un dernier gradient composé de 100% d'acétate de sodium (1 M) dans le NaOH (200 mM) durant 20 min. Enfin, le lavage de système a été réalisé en utilisant NaOH (200 mM) pendant 15 min et ensuite rééquilibré avec le NaOH (18 mM) pendant 7 min. L'identification des oses constitutifs des échantillons injectés a été déterminée par leur temps de rétention en comparaison avec les courbes étalons des monosaccharides standards. Toutes les données ont été analysées avec le logiciel Chroméleon (version 6.8).

VI.2.2.3. Analyse des monosaccharides triméthylsilylés par CPG/SM

L'étape de dératisation des monosaccharides a ensuite été réalisée selon les protocoles décrits par Pierre et al. (2012, 2014) (**Figures 62 et 63**). Un volume de 1,5 mL d'une solution de pyridine/BSTFA : TMCS (99 : 1) (1/1 v/v) préparée extemporanément a été ajouté aux résidus secs. Le mélange est laissé sous agitation (1200 rpm) durant 2 h à température ambiante. La solution est ensuite évaporée à sec sous jet d'azote dans les mêmes conditions que décrites précédemment. Les triméthylsilyl-*O*-glycosides sont finalement dissout dans du dichlorométhane (10 g/L). La même procédure a été répétée en utilisant des monosaccharides standards (Man, Glc, Ara, Rha, Rib, Fuc, Xyl, Fruc, ManA, Gal, GlcA et GalA). Les quantités de glucuronide et de glucoside ont été estimées à l'aide des courbes standards. Les échantillons ont été injectés sur un Shimadzu Nexus GC-2030 couplé à un GCMS-QP2020NX (Shimadzu, Japon), équipé d'une colonne OPTIMA-1MS (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m) de Macherey-Nagel ayant un débit d'hydrogène de 1,75 mL/min (7,8 psi). La température initiale a été établie à 100 °C pendant 2,75 min, suivie d'une première montée de 8,40°C/min jusqu'à 200°C et d'une deuxième montée de 5,20 °C/min jusqu'à 215 °C qui a été maintenue pendant 0,95 min. L'ionisation a été réalisée par impact électronique (EI, 70 eV). La température de la trappe a été réglée à 150°C et l'ion cible a été fixé de 40-800 m/z et la température de l'injecteur a été fixée à 250°C. Les proportions molaires relatives ont été calculées en utilisant la méthode de

normalisation de surface. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel MestReNova 14.3.1-31739 (Mestrelab Research, Espagne).

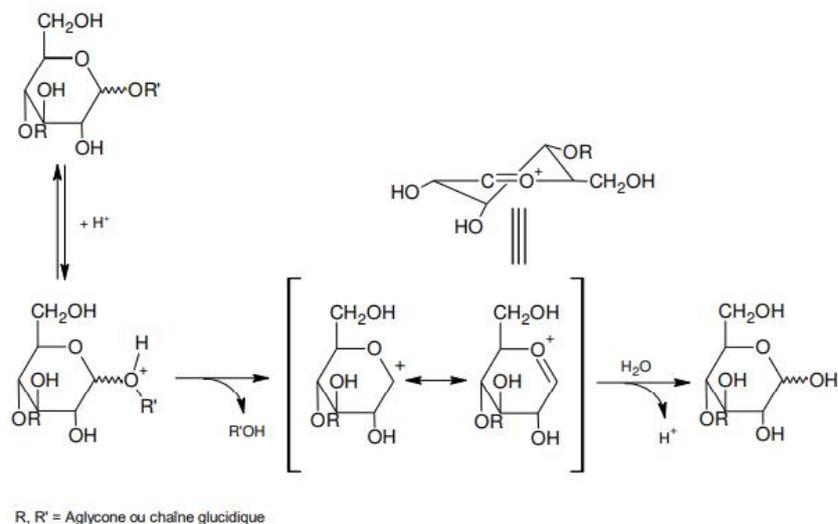


Figure 62. Mécanisme général de l'hydrolyse acide des glycosides (Bemiller et al., 1975).

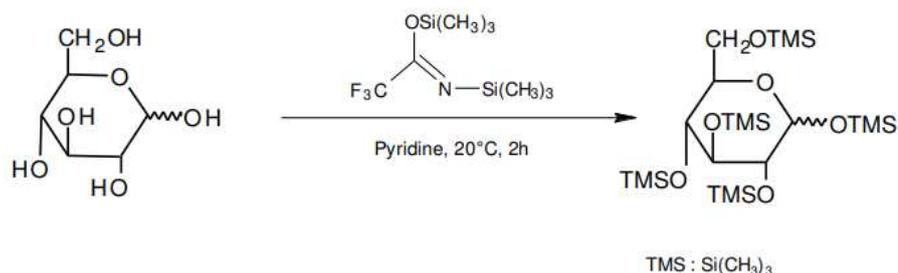


Figure 63. Mécanisme de triméthylsilylation des *O*-glycosides (adapté de Kamerling et al., 1975).

VI.2.3. Analyse des liaisons glycosidiques par CPG/SM-IE

L'analyse des liaisons glycosidiques est une étape fondamentale pour la compréhension de structure primaires des PS ainsi que la position et la nature des liaisons glycosidiques reliant les monomères. Cette analyse a été réalisée en plusieurs étapes en commençant par une méthylation des groupements hydroxyles des PS à analyser suivie par une hydrolyse liaisons *O*-glycosidiques. Les monosaccharides méthylés obtenus ont été ensuite réduits par le borodeuteride de sodium (NaBD₄) en alditols et enfin les groupements hydroxyles libres ont été acétylés afin d'obtenir finalement des acétates d'alditols partiellement méthylés (**Figure 64**).

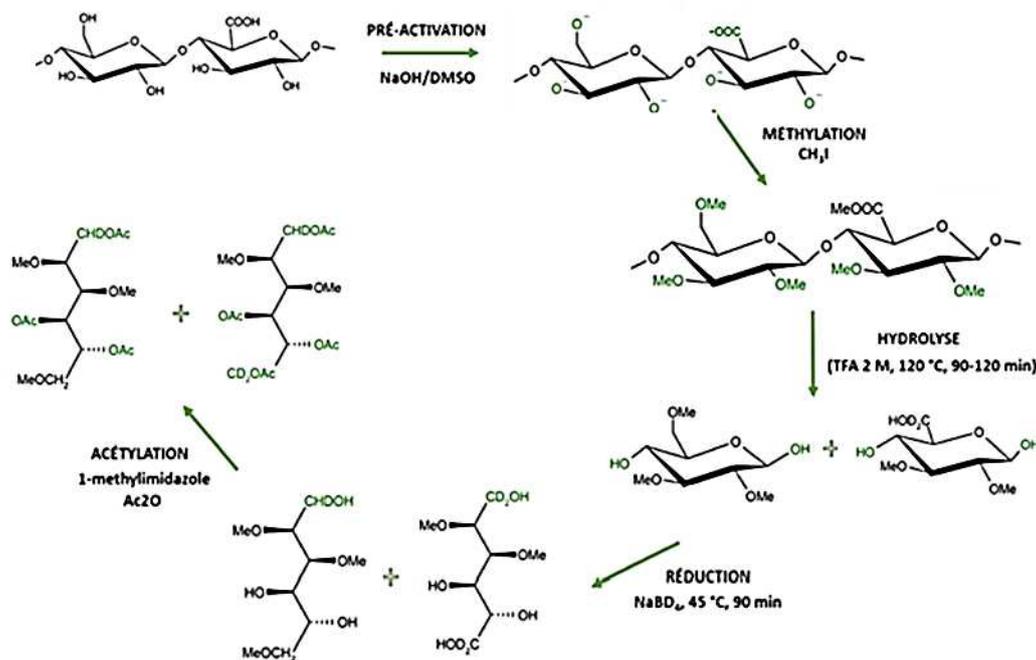


Figure 64. Procédure d'obtention des acétates d'alditols partiellement méthylés

VI.2.3.1. Méthode de préparation de Réactif NaOH/DMSO

Brièvement, selon la méthode de Ciucanu et Kerek (1984), la solution NaOH / DMSO a été préparé. Cents μL de solution de NaOH (50%, m/v) ont été introduits dans des microtubes et a été vortexé avec 200 μL de méthanol. Ensuite, 1 mL de DMSO anhydre a été ajouté sur le mélange, vortexé et centrifugé à 3 600 g, 5 min à température ambiante. Le culot obtenu a été solubilisé dans un mL de DMSO, agité et centrifugé de nouveau. Cette étape a été répétée 5 fois successives. Finalement, le culot formé a été resuspendu dans un volume final de 300 μL de DMSO. La solution NaOH/DMSO formé possède une couleur blanchâtre.

VI.2.3.2. Etape de méthylation

L'étape de méthylation a été adaptée de la méthode de Pena et al. (2012). Dans un tube en verre inerté, deux mg de PS ont été dissout dans 500 μL de DMSO à 60°C sous agitation continue à 400 rpm. Quatre cents μL de culot de NaOH /DMSO préparé ont été ajoutés à la solution, puis le mélange a été agité pendant 15 min à température ambiante

Ensuite, 300 μL d'iodométhane (CH_3I) et 20 μL d'eau (permettant d'éviter les phénomènes de dégradation oxydative), ont été ajoutés et la solution a été agitée doucement (350 rpm) pendant 15 min. Après refroidissement de la solution sur un bain marie, la méthylation a été arrêtée et un mL d'eau ultrapure a été ajouté au milieu réactionnel suivi

d'une agitation pendant 10 s. L'excès de iodométhane a été ensuite évaporé sous jet d'azote à 60°C pendant quelques minutes jusqu'à disparition du trouble au niveau de la solution (Stuart, Block Heater SBH 200D/3). Un mL de chloroforme a été ajouté, et ensuite le mélange formé a été fortement agité puis centrifugé à 3 000 x g pendant 5 min à température ambiante. La phase organique inférieure a été récupérée et transférée dans un nouveau tube en verre et lavée 3 fois avec de l'eau. Finalement, le chloroforme a été évaporé sous jet d'azote à sec à 60°C. Puis les résidus méthylés secs ont été dissout dans 1 mL de méthanol. Cette étape de méthylation a été effectuée aussi sur les standards.

VI.2.3.3. Formation d'AAPM

Deux mL de TFA (2 M) ont été ajoutés sur les échantillons méthylés, les tubes ont été placés pendant 90 min à 120 °C sous agitation (1 200 rpm). Le TFA présents dans les solutions a été évaporée à sec sous jet d'azote. Ensuite, un mL de méthanol a été ajouté sur chaque résidus secs, puis évaporée de nouveau à sec. Cette étape a été répétée 2 fois afin d'éliminer les traces résiduelles d'acide (TFA).

VI.2.3.3.1. Réduction

L'étape de réduction a été réalisée à l'aide d'une solution de borodeuteride de sodium (NaBD_4), préalablement préparée à 100 mg/mL dans une solution d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) à 1 M. Ensuite la solution obtenue a été diluée à hauteur de 5 volumes de diméthylsulfoxyde (DMSO). Six cents μL de cette solution ont été ajoutés sur les échantillons déjà méthylés et hydrolysés et ont été placés sous agitation (1 200 rpm) pendant 90 min à 45°C. A la fin de la réaction, 100 μL d'acide acétique glacial ont été ajoutés, ajout suivi d'une agitation vigoureuse des échantillons pendant 2 à 3 min afin de se débarrasser de l'excès de NaBD_4 .

VI.2.3.3.2. O-Acétylation

L'étape d'acétylation a été réalisée par l'ajout de 100 μL de 1-méthylimidazole et 75 μL d'anhydride acétique sur les échantillons. Les tubes ont été maintenus sous agitation douce à 200 rpm, pendant 30 min à 45°C. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 2 mL d'eau ultrapure suivi de l'ajout de 1 mL de dichlorométhane dans chaque tube. Les solutions ont été ensuite centrifugées (3 000 x g, 5 min, température ambiante) et la phase organique a été conservée et a été lavée 5 fois avec 2 mL d'eau ultrapure de façon à éliminer les traces de sels solubles et de DMSO. Enfin, cette phase organique (phase inférieure) obtenue a été évaporée à sec sous jet d'azote. Les acétates d'alditols partiellement méthylés (AAPM) ont été finalement dissouts

dans 200 μL de dichlorométhane avant d'être injectés et analysés en CPG/MS-IE. Un à 5 μL de chaque échantillon préparé ont été injectés et analysés sur une colonne OPTIMA-1MS en utilisant un débit et une pression d'hélium fixé à 2,3 mL/min et à 8,8 psi, respectivement. La température initiale du four a été fixé à 80 °C, durant 2 min. Après une montée de température a été programmé de 30°C/min à 170 °C. Ensuite, une seconde montée de température a été programmé de 4°C/min jusqu'à 240°C et a été maintenue pendant 20 min. L'ionisation a été réalisée par impact électronique à 70 eV. Les températures de la trappe et de l'injecteur ont été fixées à 150°C et à 250°C, respectivement. Les ions cibles ont été fixés entre 40-800 m/z.

VI.2.4. Analyse structurale par résonance magnétique nucléaire RMN

La spectroscopie RMN est largement utilisée pour la détermination des structures de PS. L'analyse structurale des PS par RMN peut permettre la détermination des monosaccharides constitutifs, leurs séquences, les différents types des liaisons glycosidiques, les ramifications associées, les configurations anomériques et les différentes substitutions aglycones (Kamerling et Gerwig, 2007). Les spectroscopies 1D (^1H et ^{13}C), présentent des signaux précis à des fréquences de résonances très spécifique. La forme de chaque signal est propre à un environnement chimique (Casu et al., 1982). Généralement, de nombreux spectres ^1H et ^{13}C sont décrits et spécifiés dans la littérature et peuvent être utilisés comme comparaison pour évaluer les déplacements chimiques. Des études en RMN 2D homonucléaires (COSY, NOESY, etc.) et hétéronucléaires (HSQC, HMBC, etc.) peuvent être utilisées afin de clarifier certains assignements, permettant aussi une meilleure description non seulement des liaisons glycosidiques mais aussi des motifs répétitifs (Størseth et al., 2008). Des études décrites par Delattre et al. (2016), prouvent que l'utilisation de plusieurs méthodes comme la méthode de désulfuration, de désacétylation, des méthodes d'hydrolyse, de dégradation chimique ainsi que d'autres méthodes de lyse éclaircissent l'élucidation structurale des différentes PS (Delattre et al., 2016).

Un g de AHS ou FHS a été hydrolysé dans 100 mL de H_2SO_4 (20%, v/v) pendant 30 min à 50°C sous agitation continue (400 rpm). Après refroidissement, les hydrolysats ont été neutralisés avec une solution de NaOH (10 M) puis dialysés avec des boudins de dialyse (3,5 kDa MWCO, 35 mm sec Martini I.D) pendant 72 h à 4°C, contre de l'eau ultra pure (avec un changement régulier de la solution et un suivi de la conductivité). Les solutions dessalées ont ensuite été lyophilisées.

Afin d'améliorer la qualité des spectres, les extraits polysaccharidiques obtenues ont été dissous 2 fois dans 1 mL de D_2O (99,9%, v/v) puis lyophilisés pour substituer les protons avec

le deutérium. Avant l'analyse, les échantillons ont été dissous de nouveau dans du D₂O (40 g/L). Les spectres RMN ont été analysés à 60°C pour les solutions de FHS et à 80°C pour les solutions d'AHS, et enregistrés à 353 K en utilisant un spectromètre Bruker (AVANCE III HD) de 500 MHz équipé d'une sonde Bruker de 5 mm (¹H/¹³C/¹⁵N) et une sonde à bobine à gradient z. Les spectres RMN ¹H ont été acquis à l'aide d'une séquence ZG et 128 scans. La largeur d'impulsion était de l'ordre de 9,7 µsec, avec un temps de relaxation de 4 s et un temps d'acquisition de 3,3 s.

Les répartitions des acides guluronique et mannuronique (FG et FM), des blocs homogènes (FGG et FMM) et hétérogènes (FGM et FMG) d'AHS ont été calculées après analyses des spectres ¹H des signaux I, II et III, selon la méthode décrite par Grasdalen (1983) et en utilisant les **Equations suivantes (12 -17)**.

$$F_G = \frac{A_I}{A_{II}+A_{III}} \quad \text{(Eq 12)}$$

$$F_{GG} = \frac{A_{III}}{A_{II}+A_{III}} \quad \text{(Eq 13)}$$

$$F_M = 1 - F_G \quad \text{(Eq 14)}$$

$$F_{GM} = F_{MG} = F_G - F_{GG} \quad \text{(Eq 15)}$$

$$F_{MM} = F_M - F_{MG} \quad \text{(Eq 16)}$$

$$M/G = F_M/F_G = \frac{1-F_G}{F_G} \quad \text{(Eq 17)}$$

VI.3. Quantification, identification et estimation des puretés des fucoxanthines et du β-carotène des fractions P-FX et P-CT

VI.3.1. Détermination des rendements massiques

Les rendements en β-carotène (P-CT) et en fucoxanthine (P-FX) ont été déterminés après purification par chromatographies sur colonne et sur couche mince (Section I.4.2.1.). Le contenu final des ballons après évaporation (40°C, 337 mbar, Stuart RE300B, Bibby Scientifics, Stone, Royaume-Uni) a été lyophilisé et les quantités de pigments déterminées par pesée.

VI.3.2. Identification et estimation de la pureté par chromatographie en phase liquide à haute performance

L'identification des fucoxanthines (P-FX) et β -carotènes (P-CT) présentes dans les fractions a été réalisée par HPLC. Le système chromatographique était constitué d'un système de pompe LC-20AT, un détecteur d'absorption UV-Vis SPD-20A et un logiciel d'analyse en ligne. Pour l'élution de la fucoxanthine (P-FX), le méthanol pur a été utilisé comme phase mobile avec un débit de 1 mL/min, tandis que l'acétate d'ammonium-MeOH-10 mM (A), le MTBE (100%, v/v) (B) et l'eau (100%) (C) constitue la phase mobile pour l'élution de β -carotène (P-CT). En effet, la séparation a été effectuée en utilisant ce gradient : de 0 à 24 min 83,00% (v/v) A, 15,00% (v/v) B et 2,00% (v/v) C, de 24 à 32 minutes 63,50% (v/v) A, 35% (v/v) B et 1,50% (v/v) C, de 32 à 34 min 33,50% (v/v) A, 66,00 (v/v)% B et 0,50% C et 35 minutes 83,00% (v/v) A, 15,00% (v/v) B et 2,00% (v/v) C. En condition de phase inverse, 20 μ L d'échantillon ont été injectés en utilisant une colonne HPLC-C18 (Luna 5 μ m, 4,6 mm, 250 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). L'élution a été réalisée à 28°C et la longueur d'onde de détection pour les deux pigments a été ajustée à $\lambda = 450$ nm. Avant l'injection, tous les échantillons ont été filtrés sur 0,22 μ m. Les standards de fucoxanthine et de β -carotène ont été dissous dans du méthanol à des concentrations de 0,125 μ g/mL et élués dans les mêmes conditions que décrites précédemment afin d'établir les gammes de calibration (Fung et al., 2013).

VI.4. Caractérisation physicochimique des fractions enrichies en fucoïdanes (FHS) et alginates (AHS)

VI.4.1. Détermination des grandeurs macromoléculaires en régime dilué par SEC/MALS

La chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de lumière (SEC/MALS) est une méthode analytique permettant d'accéder aux grandeurs macromoléculaires en régime dilué de polymères solubles, à savoir leur masse molaire moyenne en nombre (M_n), leur masse molaire moyenne en poids (M_w), leur rayon de gyration (R_g), leur rayon hydrodynamique (R_h) et leur viscosité intrinsèque ($[\eta]$). On peut noter que les PS peuvent prendre en solution différentes conformations, à savoir et à minima la forme de bâtonnet rigide, de pelote Gaussienne ou de sphère solide (Schittenhelm et Kulicke et al., 2000 ; Hwang et al., 2003).

Cette chromatographie est équipée de trois détecteurs en ligne à savoir un détecteur laser multi-angles (MALLS) à diffusion de la lumière constituée par un laser He – Ne qui absorbe à $\lambda = 690$ nm associé à une cellule K5 (50 μ L) (Wyatt Technology Corp., Heleos II, USA), un réfractomètre différentiel (DRI) (RID10 A Shimadzu, Japon) ainsi qu'un viscosimètre (Wyatt Technology Corp., Viscostar II, USA). Les colonnes (colonne de garde OHPAK SB-G, colonnes OHPAKSB806 et 804 HQ (Shodex)) ont été éluées avec une solution de LiNO_3 (0,1 M) à un débit volumique de 0,7 mL/min et le solvant d'éluion a été filtré à travers un filtre de 0,1 μ m, dégazé et après ré-filtré à l'aide d'un filtre de 0,45 μ m.

Les échantillons ont été solubilisés à une concentration de 2 g/L dans une solution de LiNO_3 (0,1 M) pendant 24 h sous agitation, filtrée sur 0,45 μ m et injectés à hauteur de 500 μ L à travers une boucle d'injection. Les données collectées ont été analysées à l'aide du logiciel Astra 6.1, avec un rapport dn/dc fixé à 0,15 mL/g.

VI.4.2. Etude des propriétés rhéologiques

La valorisation d'un PS est en relation étroite avec ses propriétés rhéologiques (en tant qu'hydrocolloïde par exemple). Les mesures rhéologiques ont été étudiées en utilisant un rhéomètre AR-2000 (TA Instruments, AR200, France) équipé d'une géométrie cône-plan (40mm) avec une Gap de 54 microns, ainsi que d'un système de contrôle de la température à effet Peltier. La résistance de polymère se voie au niveau du Gap. En effet, une cartographie de système appelé « Rotational mapping » a été exécutée lorsque la machine a été mise en marche. La solution de PS a ensuite été placée entre un cône et la plaque inférieure immobile (Fixe). Le cône a été lentement descendu vers l'échantillon en mouvement de rotation uniforme et avec une vitesse v (s^{-1}). L'échantillon a donc été entraîné par le mouvement du cône, faisant apparaître de ce fait des forces de résistance dans l'échantillon en fonction de sa viscosité. Le gap a été maintenu constant afin d'éviter la perturbation de la symétrie conique du module. Le système appliqué était en mode " soft " afin d'obtenir une meilleure sensibilité. Tous les traitements rhéologiques ont été analysés par un logiciel TA Instrument Rheology Advantage.

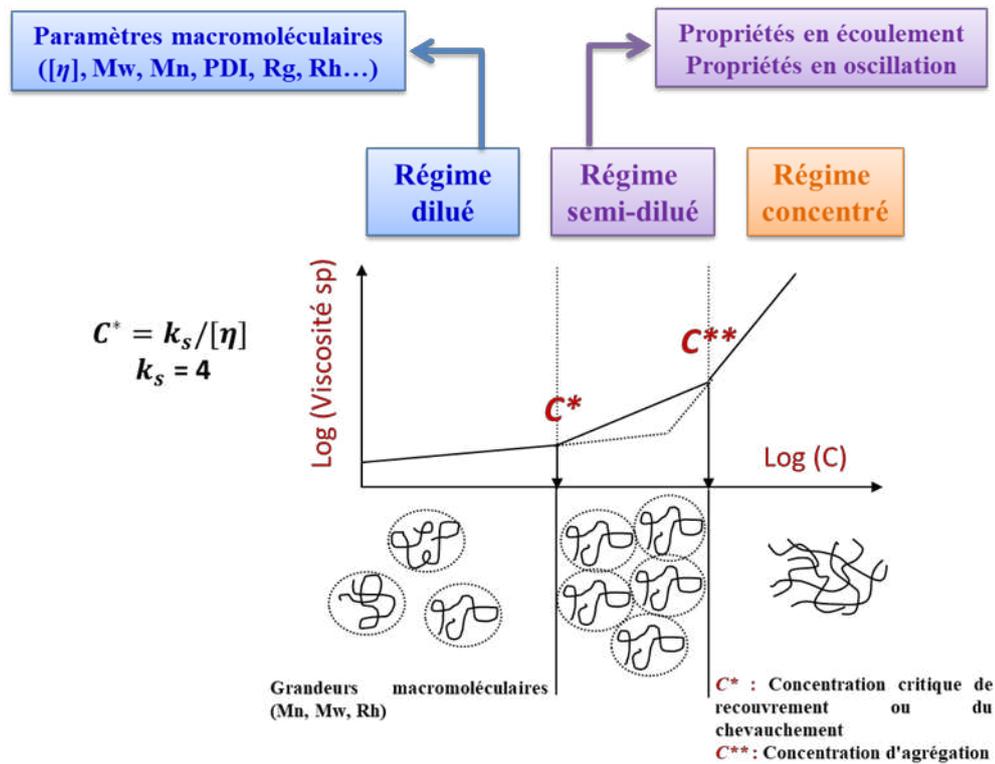
VI.4.2.1. Mesure de la concentration critique de recouvrement (C^*)

Figure 65. Etats d'enchainement des polymères en fonction de la concentration (En solution).

La concentration critique de recouvrement (C^*) correspond à la concentration de transition entre le régime dilué au niveau duquel les chaînes de PS en solution ne sont pas enchevêtrées. A l'inverse, on nomme concentration d'enchevêtrement C^{**} la concentration à partir de laquelle les chaînes polysaccharidiques s'agrègent. Au-delà, l'enchevêtrement important des chaînes implique une augmentation très forte de la viscosité par la formation d'un réseau tridimensionnel important (**Figure 65**).

C^* est exprimé en (g/L) et est mesuré en traçant la viscosité spécifique en fonction de la concentration du PS en échelle logarithmique. L'intersection de ses deux allures de droites, qui possèdent des pentes différentes et caractéristiques (environ 1,4 et 3,4, respectivement) (Benaoun et al., 2017), permet d'accéder à cette grandeur (Castelain et al., 1987 ; Benaoun et al., 2017). Théoriquement, il est également possible d'accéder à la valeur du C^* en utilisant l'**Equation 18** basée sur le modèle de Williamson, en utilisant les valeurs de microviscosité intrinsèque du polymère en solution mesurée en régime dilué :

$$\eta = \frac{\eta_0}{(1+(K\dot{\gamma})^{1-n})} \quad (\text{Eq 18})$$

Avec η : Viscosité apparente (Pa.s) ; η_0 : Viscosité à cisaillement nul (Pa.s) ; K : constante de temps (s) ; $\dot{\gamma}$: taux de cisaillement (s^{-1}) ; n : indice de fluidité ; τ : contrainte de cisaillement.

VI.4.2.2. Mesure en écoulement

La contrainte de cisaillement est décrite dans l'équation 19.

$$\tau = \eta\dot{\gamma} \quad (\text{Eq 19})$$

Avec ; τ : Contrainte de cisaillement (Pa) ; η : Viscosité dynamique (Pa.s) ; $\dot{\gamma}$: Taux de cisaillement (s^{-1}).

De ce fait la viscosité dynamique est définie dans l'Equation 20 comme étant :

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (\text{Eq 20})$$

Avec η : Viscosité dynamique (Pa.s) ; τ : Contrainte de cisaillement (Pa) ; $\dot{\gamma}$: Taux de cisaillement (s^{-1}).

Donc l'évolution de viscosité en fonction de taux de cisaillement permet de définir quatre catégories de fluides comme montré dans la figure 66 :

- Les fluides newtoniens : leur viscosité est indépendante de leur taux de cisaillement ;
- Les fluides plastique (à seuil) : le seuil représente la minimum d'énergie qu'il faut franchir pour que l'écoulement aura lieu ;
- Les fluides pseudoplastiques (rhéofluidifiants) : diminution de la viscosité est corrélé avec une augmentation de taux de cisaillement ;
- Les fluides rhéoépaississants : augmentation de viscosité est corrélé avec une augmentation de taux de cisaillement.

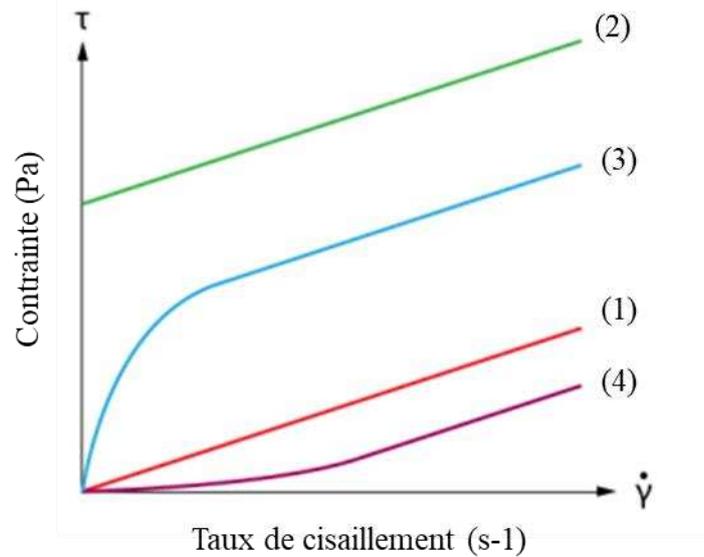


Figure 66. Comportements rhéologiques des fluides.

Les mesures de viscosité apparente ont été exprimées aussi en utilisant le modèle de Sstwald-de Waele (Hentati et al., 2020) et en suivant la loi de puissance pour caractériser le comportement rhéofluidifiant de la solution de AHS (**Equations 21 et 22**)

$$\tau = k \dot{\gamma}^n \quad \text{(Eq 21)}$$

$$\tau = \tau_0 + k \dot{\gamma}^n \quad \text{(Eq 22)}$$

Avec τ : contrainte de cisaillement (Pa), τ_0 : contrainte de cisaillement nulle (Pa), k : indice de cisaillement ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$), $\dot{\gamma}$: taux de cisaillement (s^{-1}), n : indice de fluidité, qui peut être supérieur à 1 (comportement plastique), égal à 1 (comportement newtonien) ou inférieur à 1 (comportement pseudoplastique).

Pour la caractérisation rhéologique de la fraction AHS, des solutions à des concentrations de 0,5% à 2,5% (m/v) ont été préparées dans de l'eau déminéralisée et dans différentes autres solutions salines à savoir dans le NaCl (0,1 M), NaCl (0,5 M), KCl (0,1 M), KCl (0,5 M) et CaCl₂ (5 mM, 10 mM et 20 mM). Ces solutions ont été agitées pendant 72 h à 4°C sous agitation (400 rpm). Ensuite, 700 μL de solution AHS ont été chargés soigneusement sur le plateau inférieur (fixe) du rhéomètre et la partie qui porte le cône a été lentement descendu. Une couche fine d'hexadécane a été déposée autour de l'échantillon afin d'éviter leur évaporation pendant la mesure. Les mesures de la viscosité apparente ont été réalisés à 20°C, 25°C, 40°C et 60°C sur une plage de taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$) allant de 10^{-3} à 10^3 s^{-1} . La

contrainte de cisaillement ainsi que la viscosité (η) ont été enregistrés de différents taux de cisaillement de 10^{-3} à 10^3 s^{-1} .

VI.4.2.3. Mesure en oscillation

Les modules de conservation (G') et de perte (G'') ont été évalués par analyse oscillatoire. Ils sont sensibles à la structure moléculaire et aux interactions dans les solutions et dépendent de la fréquence et de la température. En effet, l'augmentation des températures réduit les G' et G'' des solutions d'alginate de sodium alors que ces deux paramètres G' et G'' sont augmentés avec l'élévation de la fréquence angulaire. Les valeurs du module de perte sont toujours légèrement supérieures à celles du module de conservation à basse fréquence et ont tendance à se rapprocher à haute fréquence. Le comportement des solutions aqueuses d'alginate de sodium est principalement plus visqueux qu'élastique, présentant donc un comportement viscoélastique de type fluide (Ma et al., 2014 ; Hentati et al., 2018). La mesure des deux grandeurs G' et G'' en mode oscillatoire s'effectue suite à la soumission de l'échantillon (solution d'alginate) à des déformations sinusoïdales.

Les viscosités de l'échantillon AHS de concentrations allant de 0,5% à 2,5% (m/v) ont été mesurées à 25°C en fonction de fréquences angulaires variant entre 0,01 à 100 rad. s^{-1} .

Pour la caractérisation rhéologique de AHS en mode oscillatoire, des solutions à des concentrations de 0,5% à 2,5% (m/v) ont été préparées dans de l'eau déminéralisée et dans CaCl_2 (5 mM, 10 mM et 20 mM). Ces solutions ont été agitées pendant 72 h à 4°C sous agitation (400 rpm). Ensuite, 700 μL de solution AHS ont été chargés et préparés dans les mêmes conditions que décrites précédemment. L'étude rhéologique a été réalisée en utilisant une géométrie Cône-plan de 40 mm, la Gap du système étant fixée à 54 microns. La mesure de déformation a été réalisée à 25°C sur une plage de fréquence de 0,01 à 100 rad. s^{-1} permettant de déterminer les modules G' et G'' ainsi que la caractérisation du module viscoélastique G après calcul de $\tan(G''/G')$.

VII. Evaluation des activités biologiques des polysaccharides (fractions FHS et AHS)

VII.1. Activité antioxydante

Les absorbances ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (JASCO V-730, Japon).

VII.1.1. Activité antiradicalaire

L'efficacité de piégeage des radicaux libre de DPPH a été évaluée en utilisant du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) comme décrit par Delattre et al. (2015). Un mL de solution de PS à diverses concentrations (0 à 2 g/L) a été ajouté à 1 mL d'une solution DPPH 0,1 mM dissout dans l'éthanol. Ensuite, la solution a été agitée et incubée 30 min à température ambiante et à l'obscurité, avant de mesurer son absorbance à 517 nm (Spectrophotomètre JASCO V-730, Japon). Suite à la réduction de DPPH par un composé antiradicalaire, il devient incolore et il perd sa forme radicalaire. Le pourcentage d'inhibition du DPPH a été estimée en utilisant l'Equation suivante (**Equation 23**). L'efficacité de piégeage des radicaux DPPH a été exprimée en CI_{50} qui représente la concentration de PS à laquelle le taux d'inhibition atteint 50%.

$$\% \text{ d'inhibition de DPPH} = \left(1 - \left(\frac{A_{\text{Echantillon}} - A_0}{A_{\text{Contrôle}}}\right)\right) \times 100 \text{ (Eq 23)}$$

Avec $A_{\text{Echantillon}}$: absorbances à $\lambda = 517 \text{ nm}$ de 1 mL de l'échantillon (0–2 g/L) avec 1 mL de DPPH (0,1 mM) alors que $A_{\text{Contrôle}}$ est l'absorbance à $\lambda = 517 \text{ nm}$ de 1 mL d'eau distillée avec 1 mL de DPPH à 0,1 mM dans l'éthanol et A_0 est l'absorbance de de 1 mL de l'échantillon (0–2 g/L) avec 1 mL d'éthanol.

VII.1.2. Pouvoir réducteur du Fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur a été estimé selon la méthode publié par Yan et al. (2005). Brièvement, 0,1 mL de solution de PS (0 à 2 g/L) a été mélangé avec 0,25 mL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 0,25 mL de ferricyanure de potassium (1% m/v). Ce mélange a été incubé pendant 20 min à 50 °C et placé pendant 5 min dans un bain de glace. Ensuite, 0,25 mL d'acide trichloroacétique (10% m/v) a été ajouté et le mélange a été agité pendant 1 min. Le mélange a été centrifugé (5 000 x g, 10 min, 25°C). Ensuite, 0,250 ml de surnageant a été prélevé et mélangé avec 0,250 mL d'eau distillée et 0,050 mL de $FeCl_3$ (0,1% m/v). Enfin, après 5 min de repos, l'absorbance a été mesurée à $\lambda = 700 \text{ nm}$ (Spectrophotomètre JASCO V-730, Japon). L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif. Une forte absorbance correspond à un haute pouvoir réducteur. Le pouvoir réducteur du fer est proportionnel à l'absorbance des mélanges réactionnels.

VII.1.3. Pouvoir chélateur du fer

La capacité de chélation des ions ferreux par FHS et AHS a été déterminée selon la méthode de Carter (1971). Cent μL d'une solution de FeCl_2 (2 mM) ont été ajoutés à 200 μL de différentes concentrations de PS (0-2 g/L). Après 5 min d'incubation à 25 °C, 400 μL de solution de ferrozine (5 mM) ont été ajoutés puis les solutions ont été vigoureusement agitées et incubées pendant 10 min à 25 °C. Le taux d'inhibition de la formation du complexe ferrozine- Fe^{2+} a été déterminé après mesure des absorbances à $\lambda = 562$ nm (Spectrophotomètre JASCO V-730, Japon). L'activité de chélation des ions ferreux a été estimée suivant l'**Equation 24**. L'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) a été utilisé comme contrôle positif.

$$\% \text{ Chélation de Fer} = \frac{(A_{\text{Témoin}} - (A_0 - A_{\text{Echantillon}}))}{A_{\text{Témoin}}} \times 100 \quad (\text{Eq 24})$$

Avec A_0 est l'absorbance de l'échantillon (0-2 g/L) avec ferrozine à 562 nm, $A_{\text{Echantillon}}$ est l'absorbance de l'échantillon (0-2 g/L) (sans ferrozine) et enfin $A_{\text{Témoin}}$ correspond à l'absorbance de tous les réactifs en absence de l'échantillon.

VII.1.4. Piégeage des radicaux hydroxyles

L'activité de piégeage du radical hydroxyle a été quantifiée en utilisant la méthode décrite par Delattre et al. (2015). En effet, 0,2 mL de l'échantillon (0-2 g/L) a été ajouté à 0,2 mL d'une solution aqueuse de FeSO_4 à 5 mM. Après agitation, 0,2 mL d'une solution aqueuse de H_2O_2 à 1% (m/m) a été ajouté au mélange. La solution a été agitée et incubée à température ambiante pendant 60 min. Enfin, 1 mL d'eau distillée a été ajouté et l'absorbance a été mesurée à $\lambda = 510$ nm (Spectrophotomètre JASCO V-730, Japon). Le pourcentage d'inhibition de radical hydroxyle a été calculée en utilisant l'**Equation 25**.

$$\% \text{ d'inhibition radical hydroxyle} = \frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Echantillon}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100 \quad (\text{Eq 25})$$

Avec $A_{\text{Echantillon}}$: absorbance à $\lambda = 510$ nm de 0,2 mL de l'échantillon (0-2 g/L) avec 0,4 mL de solution de FeSO_4 (5 mM) et H_2O_2 (1%, m/m) et $A_{\text{Contrôle}}$: absorbance à $\lambda = 510$ nm de 0,2 mL d'eau distillé avec 0,4 mL de solution de FeSO_4 (5 mM) et H_2O_2 (1%, m/m).

VII.1.5. Piégeage d'anions superoxydes

L'activité de piégeage de l'anion superoxyde a été mesurée selon la méthode publiée par Wang et Luo (2007). En effet, 0,42 mL d'échantillon (0-2 g/L) a été mélangé avec 0,45 mL de Tris-HCl (50 mM, pH 8,2) puis incubé 20 min à 20°C. Ensuite, 30 µL de solution de pyrogallol (5 mM) ont été ajoutés et le mélange a été agité. Après 5 minutes d'incubation, 0,1 mL d'une solution d'acide ascorbique (5%, m/v) a été ajouté pour arrêter la réaction et l'absorbance a été mesurée à $\lambda = 325$ nm (Spectrophotomètre JASCO V-730, Japon). Le pourcentage d'inhibition radicalaire de l'anion superoxyde a été calculée en utilisant **l'Equation 26** :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Echantillon}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100 \quad (\text{Eq 26})$$

Avec $A_{\text{Echantillon}}$ est l'absorbances à $\lambda = 325$ nm de 0,420 mL de l'échantillon (0-2 g/L) avec 0,450 mL de Tris-HCl (pH 8,2 ; 50 mM) et avec 30 µL de pyrogallol (5 mM) et 0,1 mL d'acide ascorbique (5%, m/v) alors que $A_{\text{Contrôle}}$ est l'absorbance de 0,420 mL d'eau distillé avec 0,450 mL de Tris-HCl (pH 8,2 ; 50 mM) et avec 30 µL de pyrogallol (5 mM) et 0,1 mL d'acide ascorbique (5%, m/v).

VII.2. Activité anti-inflammatoire

Cette activité a été mesurée en suivant les protocoles de Kandikattu et al. (2013), Osman et al. (2016) et Chakou et al. (2021), avec de légères modifications afin de tester la capacité des PS FHS et AHS à inhiber la dénaturation d'une protéine témoin (BSA), induite par la chaleur (70°C). Les extraits de polysaccharides et de diclofénac (témoin positif) ont été préparés à des concentrations de 1 à 10 g/L (m/v). Un mL de chaque extrait (ou du témoin) a été additionné à 1 mL d'une solution de BSA (0,2%, m/v) préalablement préparée dans du Tris-HCl (pH 6,6). Après incubation à 37°C pendant 20 min, suivie d'une seconde incubation à 70°C pendant 10 min, toujours dans un bain marie, les échantillons ont été refroidis et la turbidité a été mesurée à $\lambda = 660$ nm. L'inhibition de la dénaturation de l'albumine a été calculée suivant **l'Equation 27**, les essais ayant été réalisés en triplicata.

$$\% \text{ d'inhibition} = \left(1 - \left(\frac{D}{C}\right)\right) \times 100 \quad (\text{Eq 27})$$

Avec D : absorbance de la solution testée à $\lambda = 660$ nm et C : absorbance du contrôle négatif (absence d'inhibiteur de BSA) mesurée également à $\lambda = 660$ nm.

VII.3. Activité anticoagulante

L'activité anticoagulante des polysaccharides (fractions FHS et AHS) a été déterminée à l'aide du test de temps de céphaline activé (TCA) ainsi que par la détermination du taux de prothrombine (TP). Réalisées en triplicatas, ces expériences ont été menées à l'aide d'un coagulomètre (Behnk Elektronik, Thrombotimer 2, N° série 412129). Du plasma humain normal citraté selon les spécifications du fabricant (Biolabo sas, France) a été utilisé au cours des manipulations, obtenu à partir du sang de sujets anonymes sains, sans traitement, âgés de 25 à 45 ans. Le prélèvement a été fait par ponction veineuse et le sang a été mélangé à une solution de citrate trisodique (3,8%, m/v), puis centrifugé (2 400 g, 20 min) pour obtenir un plasma déplété en plaquettes. Le plasma citraté a été recueilli et stocké à -80°C jusqu'à son utilisation (Zhang et al., 2010). Le temps de céphaline activée (TCA) constitue un test d'étude du fonctionnement de la voie intrinsèque tandis que le temps de prothrombine (TP) permet d'étudier le fonctionnement de la voie extrinsèque. Des solutions mères de FHS et AHS de 10 mg/mL ont été préparées dans de l'eau distillée à une concentration de 1% (v/v) (Yoon et al., 2002), puis des dilutions en cascades ont été réalisées afin de réaliser les tests décrits dans les sections suivantes.

VII.3.1. Taux de prothrombine

Le test de prothrombine reflète l'efficacité globale du système extrinsèque. Il est sensible aux variations des taux de facteurs V, VII et X, et, dans une moindre mesure, au facteur II (prothrombine). On détermine le temps de coagulation à 37°C en présence de thromboplastine tissulaire et de calcium. Le temps de Quick ainsi mesuré pourra être converti en taux de prothrombine ou en International Normalized Ratio (INR) (Biolabo kit). Brièvement, 90 µL de plasma ont été mélangé à 10 µL de solution de polysaccharides (de 0,625 mg/mL à 10 mg/mL). Deux cents µL de réactif de thromboplastine (TP) ont été ajoutés au mélange. Le temps de coagulation a alors été enregistré en utilisant le coagulomètre et les résultats exprimés en temps de Quick (TQ en s). Le TQ a été converti en % taux de prothrombine (**Equation 28**) et en INR correspondant à l'aide d'un tableau de conversion décrit dans les travaux de Yoon et al. (2002).

$$\text{Calcul de INR} = \left(\frac{\text{Temps de Quick échantillon}}{\text{Temps de Quick moyen normal}} \right)^{ISI} \quad (\mathbf{Eq\ 28})$$

VII.3.2. Temps de céphaline (TCA)

Connue aussi sous le nom Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT), ce test de dépistage permet d'identifier des déficiences en facteurs VIII, IX, XI et XII. Le test TCA permet la recalcification du plasma par le chlorure de calcium en présence d'une quantité de céphaline (substitut de plaquettes) et d'un activateur du facteur XII (kaolin) (Biolabo kit). Brièvement, 90 μ L de plasma ont été introduits dans chaque tube ainsi que 10 μ M d'une solution de polysaccharides de concentrations 0,625 mg/mL à 10 mg/mL. Après incubation pendant 2 min à 37°C, 100 μ L de réactif TCA ont été ajoutés et incubés pendant 2 min à 37°C. Enfin, 100 μ L d'une solution de CaCl₂ (0,025 M) ont été ajoutés au mélange. Le temps de coagulation a été enregistré à l'aide d'un coagulomètre KC1A (Thrombotimer "Behnk électronique") (Karakci et al., 2013).

VII.4. Activité antivirale

VII.4.1. Culture cellulaire

Des cellules rénales de singe vert d'Afrique (lignée cellulaire Vero n°ATCC CCL81) ont été cultivées dans du milieu essentiel minimum d'Eagle (MEM, Laboratoire Eurobio) additionné avec 8% (v/v) de sérum de veau fœtal (FCS), auquel a été préalablement ajouté 1% (v/v) de PCS (Penicill 10 000 U, colimycine 25 000 U, streptomycine 10 mg). Les cellules ont été systématiquement renouvelées tous les 3 jours.

VII.4.2. Préparation des suspensions en particules virales (Virus: Herpes simplex)

Les stocks de virus Herpes simplex ont été préparés en incubant des monocouches Vero dans des flacons de culture de 75 cm² ensemencés avec 350 000 cellules/mL et en incubant à 37°C, dans une atmosphère contenant 95% d'air et 5% de CO₂ (v/v). Deux ou trois jours après l'infection, les cultures ont été congelées et décongelées deux fois. Ensuite, des centrifugations à faible vitesse ont été réalisées afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant obtenue a été conservée à -70°C jusqu'à son utilisation. Les titrations des virus ont été effectuées par la méthode de dilution de Reed et Muench. (1938), en utilisant des plaques de micro-titration à 96 puits. Le dénombrement viral a été estimé à partir de la cytopathogénicité et exprimé par des doses infectieuses à 50% par millilitre ($2 \times 10^{7.4}$ DI₅₀/mL).

VII.4.3. Etude de cytotoxicité et de l'activité antivirale par la méthode du neutral red dye

Des dilutions de l'extrait de polysaccharides de 500 µg/mL à 1 µg/mL ont été préparées dans de Eagles milieu minimum essentiel (MEM) additionné de 8% de FCS et distribuées dans des plaques 96 puits (Nunclon, Intermed). Une série comprenait huit concentrations de chaque extrait de PS à tester allant de 500, 200, 50, 10, 5 à 1 µg/mL (4 puits par concentration). Cents µL de suspension cellulaire ($3,5 \times 10^5$ cellules Vero/mL) dans du MEM d'Eagle contenant 8% de sérum de veau fatale (FCS) ont été distribués dans les puits à l'aide d'une pipette multicanaux Titertek® et infectés par le HSV-1. Cinquante µL de suspensions de cellules simulées et infectées par des virus à une multiplicité d'infection (MOI) de concentration ($DI_{50}/\text{cellules}$ est égale à 0,001) ont ensuite été transférés dans chaque puits contenant les polysaccharides et ont été incubés pendant 3 jours sans changement de milieu, à 37°C et 5% CO₂. Les cellules et les contrôles de virus ont été exécutés simultanément. Après examen microscopique permettant de vérifier la croissance du virus, 50 µL de colorant rouge neutre (0,15% dans une solution saline, pH 5,5) ont été ajoutés à chaque puits et les cultures ont été incubées pendant 45 min à 37°C (McLaren et al., 1983). L'excès de colorant a été éliminé par rinçage avec une solution saline de tampon phosphate (PBS) de pH 7,2 (Biomérieux) et le rouge neutre incorporé par les cellules viables a été déterminé suite à l'ajout de 100 µL/puits de tampon citrate d'éthanol (0,1 M) composé de tampon de citrate à pH=4 et d'éthanol (v/v). Après agitation de la plaque pendant 20 min afin d'éliminer les monocouches de cellules, les absorbances des puits ont été mesurées avec un spectrophotomètre multicanal (Packard Spectra Count™) à $\lambda = 540$ nm. L'absorbance était directement liée aux pourcentages de cellules viables. La droite de la régression a été déterminée pour chaque essai et pour chaque plaque en se basant sur des témoins cellulaires (0% CPE) et des témoins viraux (100% CPE) (Langlois et al., 1986). La concentration cytotoxique à 50% (CC_{50}) du composé testé a été définie comme la concentration ayant diminué l'absorbance des cellules infectées de moitié par rapport à celles des témoins. La concentration efficace antivirale à 50% (CE_{50}) a été exprimée comme étant la concentration protégeant 50% des cellules infectées d'une lyse par le HSV. Le pourcentage de protection a été calculé selon l'Equation 29.

$$CE(\%) = \left[\frac{(OD)_{\text{tHSV}} - (OD)_{\text{cHSV}}}{(OD)_{\text{cMOCK}} - (OD)_{\text{cHSV}}} \right] \times 100 \quad (\text{Eq 29})$$

Avec $(OD_t)_{HSV}$: absorbance de l'échantillon à tester, $(OD_c)_{HSV}$: absorbance du contrôle infecté par le virus (absence de l'échantillon) et $(OD_c)_{MOCK}$: absorbance du contrôle (Fausse infection). Le rapport de $(OD_c)_{HSV}$ à $(OD_c)_{MOCK}$ est utilisé comme contrôle négative.

VII.5. Activité antidiabétique

Le pouvoir antidiabétique des deux fractions FHS et AHS a été évalué par l'inhibition de l' α -amylase et de la trypsine.

VII.5.1. Inhibition de l' α -amylase

La méthode de Bernfeld a été utilisée pour déterminer l'activité inhibitrice de l' α -amylase (Bernfeld et al, 1955 ; Choudhary & Mishra, 2017 ; Kawee-Ai et al., 2019). Pour la préparation de l'enzyme, l'amylase pancréatique de porcine a été dissoute dans de l'eau distillée à 4°C à une concentration de 4 U/mL alors que la solution d'amidon 0,5% (m/v) a été dissoute dans une solution composée de 20 mmol/L de tampon de phosphate (pH=6,9) et 6,7 mmol/L de chlorure de sodium. Quarante μ L d'extrait de FHS ou AHS dissous l'eau distillée à 10 mg/mL (m/v) ont été mélangés avec 400 μ L de la solution d'amidon et 160 μ L d'eau distillée. Deux cents μ L de la solution enzymatique (4 U/mL) ont été ajoutés en début de réaction, puis le mélange a été incubé pendant 3 min à 25°C. Deux cents μ L du mélange ont été prélevés puis transférés dans un tube en verre contenant 100 μ L d'une solution de DNS préalablement préparée (96 mmol/L de 3,5-dinitrosalicylique mélangé avec 5,31 mol/L de tartrate de sodium et de potassium dans 2 mol/L de NaOH). Ensuite, le mélange a été incubé à 85°C pendant 15 min, puis dilué par l'ajout de 900 μ L d'eau distillée. L'absorbance a été mesuré à $\lambda = 540$ nm Spectrophotomètre Thermo Scientific Biomate-160, USA). L'acarbose (Sigma) a été utilisé comme contrôle positif (Choudhary & Mishra, 2017 ; Kawee-Ai et al., 2019). L'activité inhibitrice de l' α -amylase a été estimé en suivant l'**Equation 30**.

$$\text{Inhibition de } \alpha\text{-amylase (\%)} = \frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Echantillon}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100 \quad (\text{Eq 30})$$

Avec $A_{\text{Contrôle}}$ et $A_{\text{Echantillon}}$: absorbances du contrôle et de l'échantillon à $\lambda = 540$ nm.

VII.5.2. Inhibition de la trypsine

L'activité enzymatique a été mesurée selon la méthode de Kunitz (Kunitz et al., 1947). Cinquante μL d'une solution de trypsine (2 mg/mL, préparée dans du tampon Tris-HCl (0,1 M, pH 8)) ont été pré-incubés pendant 30 min avec 100 μL de solution de fucoïdane ou d'alginate dissout initialement dans l'eau distillée 10 mg/mL (m/v). Un volume de 0,5 mL de caséine (1%, m/v, préparé dans du tampon Tris-HCl (0,1 M, pH 8)) a été ajouté et le mélange a été incubé à 37°C pendant 30 min. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 0,5 mL d'acide trichloroacétique (TCA, 0,44 M) (Elleuch et al., 2021). Ce mélange a été centrifugé à 5 000 x g, 20 min, température ambiante) et l'absorbance a été mesurée à $\lambda = 280 \text{ nm}$ Spectrophotomètre Thermo Scientific Biomate-160, USA). L'activité d'inhibition a été calculée à l'aide de **l'équation 31**.

$$\text{Inhibition de trypsine (\%)} = \frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Echantillon}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100 \quad (\text{Eq 31})$$

Avec $A_{\text{contrôle}}$ et $A_{\text{Echantillon}}$ correspondant respectivement à l'absorbance du contrôle et de l'échantillon à $\lambda = 280 \text{ nm}$.

VII.6. Activité antibactérienne

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des fractions FHS et AHS a été déterminée contre les bactéries *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Salmonella enterica* ATCC 14028 et *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Le milieu de gélose de Luria-Bertani (LB) a été utilisé pour le maintien des souches bactériennes (Bertani, 1951 ; Elleuch et al., 2015). Ces tests ont été réalisés dans des microplaques stériles 96 puits avec un volume final dans chaque puits de microplaque de 100 μL . Cent μL de chaque extrait (0,01 à 2 mg/mL) ont été déposés dans chaque puits, puis 10 μL de suspension cellulaire ont été ajoutés (préalablement préparée pour chaque bactérie dans un milieu LB liquide à une densité bactérienne de 10^6 UFC/mL). Des témoins positifs de croissance pour chaque micro-organisme ont été réalisés, dans les mêmes conditions, en ajoutant du milieu de culture seul et des contrôles négatives contenant le DMSO. Les plaques ont été incubées pendant 24 h (Gulluce et al., 2007).

La CIM a été définie comme la concentration la plus faible de chaque extrait à laquelle aucun trouble n'était visible à l'œil nu après incubation, après ajout d'un indicateur de croissance. Pour se faire, 25 μL d'une solution d'Iazoly Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Allemagne) préparée à 0,5 mg/mL dans de l'eau stérile, ont été

ajoutés à chaque et incubés pendant 30 min. Après ajout de MTT, le sel incolore de tétrazolium agit comme un accepteur d'électron et est réduit à un formazan de couleur rouge si les micro-organismes sont biologiquement actifs. Le cas échéant, les solutions dans les puits deviennent claires voire incolores (Chandrasekaran et Venkatesalu, 2004 ; Akermi et al., 2022).

VI.7. Activité élicitrice

VII.7.1. Dépolymérisation des alginates de sodium (AHS) préparation des oligo-alginates

Une hydrolyse radicalaire a été réalisée en utilisant le peroxyde d'hydrogène comme agent dépolymérisant. La fraction AHS a été dissoute dans de l'eau distillée à une concentration de 10 g/L et agités pendant 2 h à 70°C afin d'améliorer sa solubilité. Brièvement, 2,85 mL d'H₂O₂ (35%, m/m) ont été ajoutés à 50 mL de la solution d'alginates de concentration (2% (m/v)) (rapport 1/1, m/m). Le mélange a ensuite été incubé pendant 6 h à 60°C sous agitation (500 rpm), et 5 mL ont été prélevés toutes heures. La réaction a été arrêtée grâce à l'ajout d'éthanol 96 % (dans un rapport 1/10, v/v), sous agitation douce pendant 1 h à température ambiante. Les échantillons ont pour terminer été lyophilisés, dissous de nouveau dans de l'eau distillée (80 mg/mL) et lavés plusieurs fois contre de l'éthanol (96%). Les différentes fractions obtenues (à différents temps) ont été préparées dans de l'eau distillée, lyophilisées et stockés à 4°C avant utilisation (Bouissil et al., 2020).

VII.7.2. Culture des plantes et test d'élicitation

Des semences de tomates de type Campbell 33 ont été utilisées. Les graines ont été déposées individuellement dans des pots de 17 cm contenant un substrat de germination. Deux semaines après la germination, les plantules ont été mis dans des sacs de culture en plastique (22 × 10 × 8 cm) contenant un mélange de terre et de tourbe (v/v). Les plantes ont été cultivées dans des chambre de culture à 26°C en suivant un cycle de 16 h/8 h (lumière/obscurité). Après 45 jours de germination, l'élicitation a été réalisée par injection à l'aide d'une seringue, dans le milieu internodal des plants de tomates, de 20 µL de chaque solution oligosaccharidique préalablement préparée à une concentration de 3 g/L dans de l'eau distillée (pH = 6). Une injection d'eau distillée seule a servi de contrôle. Huit plants de tomates, d'au moins 50 cm de hauteur et possédant huit feuilles organisées, ont été collectés après injection, aux temps 0, 12, 24, 72 et 120 h. Deux feuilles apicales de chaque plant testé ont également été coupées, congelées dans de l'azote liquide, broyées avec un mortier puis stockées à -20°C pour des

analyses ultérieures (Sections I.7.7.3. et I.7.7.4) (**Figure 67**). Toutes les expériences ont été menées trois fois dans des conditions identiques.



Figure 67. Protocole d'explication des activités élicitrices.

VII.7.3. Extraction et mesure de l'activité phénylalanine ammonia-lyase (PAL)

Trente mg de poudres des feuilles de tomate ont été pesées et macérées dans 2 mL de tampon d'extraction composé de Tris-HCl (100 mM, pH 7), de 2-mercaptoéthanol (14 mM) et d'une solution de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) (3%, m/v). Le mélange a été centrifugé ($10\,000 \times g$, 30 min, 4°C) (Universal 320 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Allemagne) et le surnageant a été récupéré, auquel ont été ajoutés 200 μL d'un extrait enzymatique, préparé extemporanément (1 mL de Tris-HCl (100 Mm, pH = 6) et 200 μL de L-phénylalanine (20 Mm). La réaction a été réalisée à 30°C pendant 30 min et arrêtée par l'addition de 100 μL d'une solution de HCl (6 M) (El modafar et al., 2012). L'activité PAL a été estimée suivant l'équation 32 en mesurant l'acide trans-cinnamique synthétisé à $\lambda = 290$ nm (Jenway 6305 Spectrophotometer, Jenway, Dunmow, Essex, UK), avec un coefficient d'extinction de $9116 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Hendrikse et al., 2020).

$$\text{Activité PAL} = \frac{\text{DO}_{290} \times 1,4}{9116 \times 1000 \times \text{protein concentration } (\mu\text{g}/\text{mgFM})} \times \text{Facteur de dilution (Eq 32)}$$

VII.7.4. Extraction et quantification des composés phénoliques totaux

Vingt mg de poudre de feuilles ont été mélangés avec 2 mL d'acétone 80% (v/v). Les échantillons ont été incubés dans un bain à ultrasons pendant 30 min à 4°C. Ensuite, les extraits ont été centrifugés (10 000 × g, 15 min, 4°C). Deux cents µL de l'extrait acétonique ont été prélevés et ajoutés à un mélange contenant 250 µL de réactif Folin-Ciocalteu et 500 µL de carbonate de sodium (20%, m/v). Les échantillons ont été incubés à 40°C pendant 30 min (Budini et al., 1980). Afin d'éviter l'interaction d'éventuelles substances non phénoliques, un autre dosage a été réalisé en ajoutant 3% (m/v) de PVPP à l'extrait phénolique. Après agitation et centrifugation, le surnageant obtenu a été traité selon la même procédure que précédemment. La quantification des composés phénoliques a été réalisée en mesurant l'absorbance à $\lambda = 760$ nm (spectrophotomètre Jenway 6305, Jenway, Dunmow, Essex, Royaume-Uni) (**Equation 33**). La différence entre les absorbances la première (sans PVPP) et la deuxième mesure (avec PVPP) a été calculée pour déterminer la quantité de composés phénoliques totaux (équivalent acide gallique µg/g de MF).

$$[\text{Composés phénoliques totaux}] (\mu\text{g d'acidegallique/g (MF)}) = \frac{((\text{DO } 760 \text{ (sans PVPP)} - \text{DO } 760 \text{ (avec PVPP)}) / 0,005) / 0,1}{(\text{mg de MF})} \text{ (Eq 33)}$$

VIII. Production de vecteurs énergétiques à partir des différentes fractions

VIII.1. Production de bio-éthanol

Saccharomyces cerevisiae ATCC 7754 a été utilisé pour produire du bio-éthanol (Bahry et al., 2017). L'expérience a été menée dans des erlenmeyer de 500 mL contenant 200 mL de milieu de culture comme décrit par Kristiansen et al. (1994) et constitué de 50 g/L glucose, 3 g/L d'extrait de levure, 5 g/L de phosphate de potassium monobasique (KH₂PO₄), 2 g/L de sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄, 120 mg/L KCl, 60 mg/L CaCl₂, 2H₂O, 520 mg/L MgCl₂, 2H₂O, 35 mg/L FeSO₄, 6 H₂O, 3,8 mg/L MnSO₄, H₂O, 0,5 mg/L CuSO₄, 5 H₂O, 5 mg/L thiamine-chlorhydrique acide, 6,25 mg/L d'acide pyridoxine-chlorhydrique, 5 mg/L d'acide nicotinique; 0,125 mg/L de D-biotine, 6,25 mg/L d'acide pantothénique, 125 mg/L myo-inositol et des traces de 2,3 µg/L de ZnSO₄, 7 H₂O, 2,3 µg/L CoSO₄, 4 H₂O, 3,3 µg/L NaMoO₄, 2 H₂O, 7,3 µg/L H₃BO₃, 1,7 µg/L KI, 2,5 µg/L NiSO₄, 6 H₂O (Soyez et al., 1995) (**Tableau 2**).

S. cerevisiae a été inoculé dans des flacons bien fermés et la fermentation a été effectuée durant 48 h à 30°C sous agitation douce (200 tr/min) (INFORS HT, Bottmingen, Suisse). La croissance de la biomasse a été mesurée à $\lambda = 550$ nm (Spectrophotomètre JASCO V-730, Japon). Pour estimer la production d'éthanol, 5 mL ont été prélevés et centrifugés (10 000 \times g, 5 min, 25°C) toutes les 6 h. Ensuite, 1 mL de chaque surnageant a été déprotéiné avec 125 mL de solution d'hydroxyde de baryum (0,3 M) et 125 mL de solution de sulfate de zinc (5% m/v), puis centrifugé (10 000 \times g, 5 min, 25°C). La concentration en éthanol a été quantifiée par HPLC (1260 Infinity Quaternary système LC, Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA). Le système était équipé de deux colonnes échangeuses d'ion en série (Rezex ROA 300 7,8 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Les échantillons ont été filtrés avec un filtre d'acétate de cellulose (0,2 μ m), 10 μ L ont été injectés et élués dans une phase mobile en utilisant une solution d'acide sulfurique (5 mM) à un débit de 0,7 mL/min et à 50°C. Les concentrations en éthanol ont été mesurées à l'aide d'un réfractomètre (série HP 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) et une courbe d'étalonnage de l'éthanol (0 à 100 g/L). Le logiciel M8620AA OpenLAB Data Store Software A.02.01 a été utilisé pour analyser les résultats.

Tableau 2. Composition du milieu de culture pour production de bio-éthanol.

Milieu de base	Concentration finale (g.L ⁻¹)
Glucose	50
Extrait de levure	3
KH ₂ PO ₄	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
Sels (mg.L⁻¹)	
KCL	120
CaCL ₂ ;2H ₂ O	60
MgCl ₂ ;6H ₂ O	520
FeSO ₄ ;6H ₂ O	35
MnSO ₄ ;H ₂ O	3,8
CuSO ₄ ;5H ₂ O	0,5
Traces (μg.L⁻¹)	
ZnSO ₄ ;7H ₂ O	2,3
CoSO ₄ ;7H ₂ O	2,3
Na ₂ MoO ₄ ;2H ₂ O	3,3

H ₃ BO ₃	7,3
KI	1,7
NiSO ₄ ·6H ₂ O	2,5
Vitamines (mg.L⁻¹)	
Thiamine HCl	5
Pyridoxine	6,25
Ac nicotinique	5
D-biotine	0,125
Ca D-pantothenate	6,25
Myo-inositol	125

VIII.2. Production de biohydrogène

La génération de biohydrogène a été réalisée à partir d'une fermentation anaérobie à l'aide d'un consortium microbien isolé au niveau de zones d'installations et de traitement des eaux usées et traités. Du 2-bromoéthanesulfonate a été ajouté à un milieu complet afin de minimiser la production de méthane dégagé à partir de la communauté des archées et stabiliser ainsi le consortium (Béligon et al., 2018). La composition de ce milieu de culture était : 18 g/L K₂HPO₄, 18g/L KH₂PO₄, 72g/L (NH₄)₂SO₄, 12 g/L NaCl, 1,2 g/L MgSO₄, 7 H₂O, 1,2 g/L CaCl₂, 2 H₂O, 0,15 g/L MnSO₄, 6 H₂O, 0,015 g/L CoCl₂, 6 H₂O, 0,4 g/L FeSO₄, 7 H₂O, 6 g/L H₃BO₃, H₂O, 8,2 g/L ZnCl₂, 2,6 g/L NiCl₂, 6 H₂O, 1,5 g/L CuCl₂, 2 H₂O, 2,6 g/L Na₂MoO₄, H₂O, 75 g/L FeCl₂, 4 H₂O, 0,12 g/L hémine, 0,24 g/L biotine, 0,12 g/L PABA, 0,12 g/L de résazurine.

Ce milieu de culture a été supplémenté en glucose à des concentrations de 20 et 10 g/L respectivement, pour la préculture et la culture finale. D'autres composants, tels que 0,6 g/L de L-cystéine et 4,8 g/L de carbonates Na₂CO₃ ont également été ajoutés pour éliminer l'oxygène de la culture et maintenir le pH à 6 (**Tableaux 3 et 4**). Les précultures ont été préparées dans des flacons de 90 mLensemencés par 10 mL de consortium, l'ensemble étant incubé 12 h à 30°C sous agitation constante (150 rpm). Ensuite, les cultures finales ont été préparées dans des Falcons contenant 90 mL de milieu de culture, 10 mL de la préculture et supplémentées soit en biomasse macroalgale soit en co-produits d'extraction à une concentration 10 g/L.

L'étape de fermentation anaérobie a été réalisée à 30°C (150 rpm) (Noblecourt et al., 2017). Un spectrophotomètre (Biomate 3S, spectrophotomètre UV/vis, Thermo Scientific,

France) a été utilisé pour mesurer la turbidité des cultures à 600 nm. Après 24 h, 5 mL de culture ont été prélevés et centrifugés ($10\,000 \times g$, 5 min, 25°C). Un mL du surnageant prélevé a été traité et analysé par HPLC, comme détaillé précédemment (Section I.8.1), en utilisant des gamme étalon pour quantifier les concentrations en acides gras volatils (AGV) tels que l'acétate (1,25 à 20 g/L), le propionate (1 à 20 g/L) et le butyrate (1 à 20 g/L).

Après 24 h de fermentation en anaérobiose, le volume de biogaz a été quantifié à l'aide d'un Seringue Terumo®. Sa qualité et sa composition, notamment la concentration en biohydrogène, ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse (Agilent 3000 A, Agilent Technologies, France) équipé d'une colonne 5 Å à 60°C et 30 psi. Les données obtenues ont été quantifiées à l'aide du logiciel Soprane (Béligon et al., 2018).

Tableau 3. Composition des solutions.

Solution minérale	Composition	Concentration (g.L^{-1})
1	K_2HPO_4	18
2	KH_2PO_4	18
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	72
	NaCl	12
3	$\text{MgSO}_4 ; 7\text{H}_2\text{O}$	1,2
	$\text{CaCl}_2 ; 2\text{H}_2\text{O}$	1,2
	$\text{MnSO}_4 ; 6\text{H}_2\text{O}$	0,15
	$\text{CoCl}_2;6\text{H}_2\text{O}$	0,015
	$\text{FeSO}_4;7\text{H}_2\text{O}$	0,4
4 (20X)	H_3BO_3	6
	ZnCl_2	8,2
	$\text{NiCl}_2;6\text{H}_2\text{O}$	2,6
	$\text{CuCl}_2;2\text{H}_2\text{O}$	1,5
	$\text{NaMoO}_4;2\text{H}_2\text{O}$	2,6
	$\text{FeCl}_2;4\text{H}_2\text{O}$	75

Tableau 4. Composition du milieu de culture pour production de biohydrogène.

Solution minérale 1	7,5%
Solution minérale 2	7,5%
Solution minérale 3	0,02%
Solution minérale 4 (20x)	5%
Biotine	0,02%
PABA	0,01%
Hémine	0,1%
Résazurine	0,1%
Substrat : Glucose	Variable
H₂O	97,3%
Na₂CO₃	0,4%
Cystéine	0,05%

VIII.3. Production de bio-diesel

VIII.3.1. Production des lipides

La souche *Yarrowia lipolytica* (MUCL 28849) a été isolée par l'industrie des champignons et des bactéries en Belgique (Fontanille et al., 2012) et a été maintenue à 4°C sur un milieu PDA constitué de pomme de terre, de gélose et de dextrose.

En effet, la composition de milieu de culture pour la production de biohydrogène était : 3 g/L K₂HPO₄, 3g/L Na₂HPO₄, H₂O, 3g/L de (NH₄)₂SO₄, 1g/L MgSO₄, 7H₂O, 0,040 g/L ZnSO₄, 7H₂O, 0,016g/L FeSO₄, 7H₂O, 0,0038 g/L MnSO₄, H₂O, 0,023 g/L CaCl₂, 2H₂O, 0,5 mg/L CoCl₂, 6H₂O, 0,0009 g/L CuSO₄, 5H₂O, 0,00006 g/L Na₂MoO₄, 2H₂O et 0,003 g/L H₃BO₃.

Ce milieu a été supplémenté de 10 mL/L d'une solution minérale contenant 0,38 g/L MnSO₄, 0,3g/L H₃BO₃, 4g/L ZnSO₄, 7H₂O, 1,6 g/L FeSO₄, 7H₂O, 2,3 g/L CaCl₂, 2H₂O, et 1mL/L de solution métallique. De plus, la solution métallique est composé de 0,06 g/L Na₂MoO₄, 2H₂O, 0,5g/L CoCl₂, 6H₂O et 0,9 g/L CuSO₄, 5H₂O (Christophe et al., 2012). Avant autoclavage de milieu de culture dédié pour la production de biohydrogène, leur pH de ce milieu a été diminué jusqu'à 4,5 en utilisant l'acide orthophosphorique 85% (v/v). Ensuite

(après l'autoclavage à 121°C), ce milieu de culture a été réglé à un pH 6 en utilisant une solution de KOH 1M (**Tableaux 5,6 et 7**).

Une préculture a été préparée dans des erlenmeyers contenant 200 mL de milieu de culture et supplémenté par une concentration en glucose (4 g/L) (témoin) et inoculé par la levure *Y. lipolytica*, l'ensemble étant incubé pendant 24 h à 30 °C dans un incubateur rotatif à 100 rpm (INFORSHT, Multitron Standard, Suisse).

Ensuite, les cultures finales ont été préparées dans des erlenmeyers contenant 190 mL de milieu de culture, 10 mL de la préculture et supplémenté par un substrat à savoir RPS, BP1-PS et BP2-F séparément à des concentrations de 2 g/L. Le glucose a été utilisé comme contrôle positif à la même concentration de 2 g/L. Enfin, les cultures finales ont été incubées à 30 °C sous une agitation constante de 200 rpm durant 72 h et chaque 5 h de culture, 5 mL de chaque culture ont été prélevés dans des autres tubes Falcons.

Tableau 5. Composition du milieu de culture pour production des lipides.

Composés	Concentration en g.L⁻¹
K₂HPO₄	3
NaH₂PO₄;H₂O	3
(NH₄)₂SO₄	3
MgSO₄;7H₂O	1
ZnSO₄;7H₂O	0,04
FeSO₄;7H₂O	0,016
MnSO₄;H₂O	0,0038
CoCl₂;6H₂O	0,0005
CuSO₄;5H₂O	0,0009
Na₂MoO₄	0,00006
CaCl₂ ;2H₂O	0,023
H₃BO₃	0,003

Tableau 6. Solution du milieu de culture « lipide » concentré 100x (1mL/L).

Composés	Concentration en g.L ⁻¹
MnSO ₄ ;H ₂ O	0,38
H ₃ BO ₃	0,3
ZnSO ₄ ;7H ₂ O	4
FeSO ₄ ;7H ₂ O	1,6
CaCl ₂ ;2H ₂ O	2,3

Tableau 7. Solution du milieu de culture « lipide » concentré 1000x (1mL/L)

Composés	Concentration en g.L ⁻¹
NaMoO ₄ ;2H ₂ O	0,06
CoCl ₂ ; 6H ₂ O	0,5
CuSO ₄ ;5H ₂ O	0,9

VIII.3.2. Extraction des lipides

Les prélèvements de 5 mL ont subi une homogénéisation à haute pression pour perturber les cellules des échantillons, à travers une buse possédant une pression de 2 500 bar (Constant System Limited, Lowmars, Daventry NN11 4SD, Royaume-Uni). Un volume de 0,5 mL de chaque broyat collecté a été homogénéisé avec 4 mL de chloroforme, 2 mL de méthanol et 1 mL d'eau distillée. Puis, le mélange a été séparé par une centrifugation (2 000 x g, 10 min, température ambiante) en une phase aqueuse supérieure et une phase inférieure contenant l'extrait lipidique. Ensuite, 1 mL de chaque phase inférieure a été prélevé et déposé séparément dans des tubes à hémolyse. Les tubes ont été placés dans un concentrateur speed-vac pendant 120 min à 40°C afin de concentrer les lipides. Enfin, les lipides obtenus ont été dissout dans du chloroforme et conservés à -20 °C pour être trans estérifié et analysés par chromatographie phase gazeux.

VIII.3.3. Transesterification des lipides

Suivant la méthode de Morrisson et Smith (Année), 100 µL de chaque échantillon ont été mélangés avec 800 µL de MeOH/BF₃ (14%, v/v) et placé dans un bain-marie à 100°C pendant 15 min. Après refroidissement du mélange, une solution contenant 1,5 mL d'eau et 750 µL d'hexane et 1% (v/v) heptadécane a été ajouté. Finalement, 1 mL du mélange a été injecté et analysé par chromatographie en phase gazeuse à un débit de 0,80 mL/min (HP6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). Cette chromatographie est équipée d'une colonne de

dimension (30 m × 0,32 mm × 0,25 mm). L'identification des acides gras présent dans l'extrait a été réalisé en comparant leurs temps de rétentions avec les temps des retentions des acides gras standards réalisés dans les mêmes conditions (**Tableau 8**). Les données obtenues ont été analysées à l'aide de MestReNova 7.1 (Hadjkacem et al., 2022).

Tableau 8. Temps de rétention des standards d'acides gras

Acides gras	Temps de rétention	
Acide palmitique	19,124	19,260
Acide palmitoléique	19,763	20,260
Acide stéarique	22,404	22,551
Acide oléique	23,062	23,410
Acide linoléique	24,609	24,734
Standard interne	9,455	9,611

VIII.4. Analyse statistique

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel statistique Sigma Plot 12.5 (Systat Software, SPSS Inc., Chicago, Illinois, États-Unis). Les données ont été exprimées en moyenne de trois répliques ± écart type.

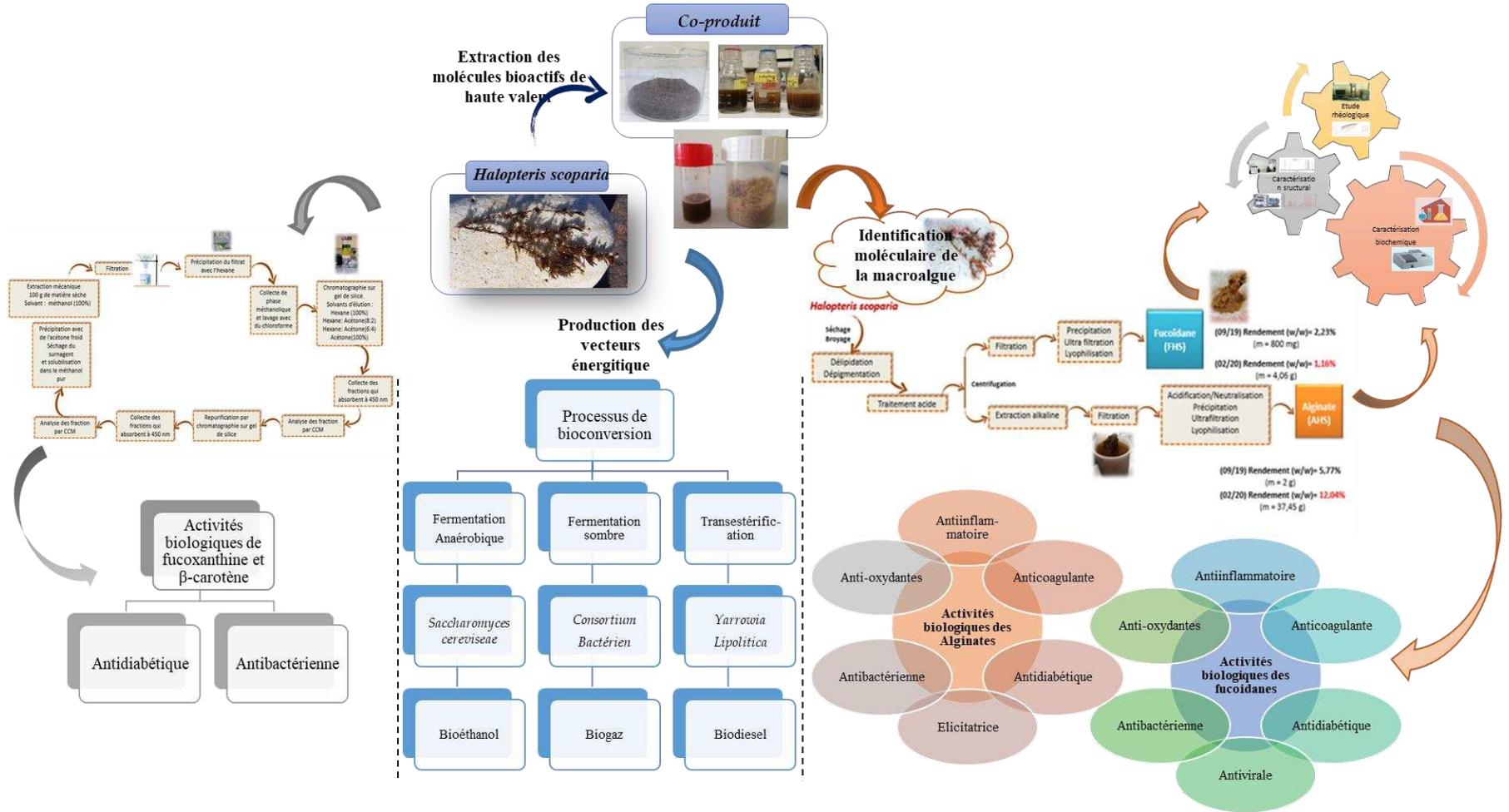


RÉSULTATS ET DISCUSSION

PARTIE III



RÉSUMÉ GRAPHIQUE :



RÉSULTATS ET DISCUSSION

De nombreux pays occidentaux manifestent un intérêt accru pour l'utilisation des macroalgues dans plusieurs secteurs tels que l'alimentation humaine et animale, les nutraceutiques, les cosmétiques et les produits pharmaceutiques, l'agriculture ou encore le domaine de la bioénergie. La biomasse d'origine marine est un élément clé dans la croissance des pays comme la Tunisie et devrait contribuer au développement de l'économie bleue des pays méditerranéens en améliorant les bénéfices sociaux et écologiques dérivés de l'utilisation durable des ressources marines, tout en réduisant les risques environnementaux.

Généralement, en Tunisie et en Afrique du Nord, les algues présentent moins d'intérêt que les bivalves et les poissons. Le littoral tunisien fait l'objet d'un développement industriel, urbain et touristique en plus d'importantes activités commerciales et de pêche dans les zones côtières qui entraînent des perturbations des écosystèmes côtiers (Afli et al., 2008). Le développement de la culture des algues pourrait contribuer à la préservation des écosystèmes côtiers (Hasselström et al., 2018). De nos jours, face au problème de la croissance de la population Tunisienne qui attendra 13,8 million de personnes en 2050, et suite aux changements climatiques, économiques et financiers ainsi que la concurrence croissante sur les ressources naturelles, l'Organisation des Nations Unies (ONU), a imposé des réglementations pour la contribution de la production halieutique dans les deux secteurs qui touchent la sécurité des aliments et la nutrition (World Bank, 2019).

Plusieurs projets de Recherche et Développement et de Recherche et Innovation ont abouti à la mise en place de l'aquaculture des algues dans les pays d'Europe du Nord (Ktari et al., 2021). Cependant, le ministère tunisien de l'agriculture, des ressources hydrauliques et de la pêche, a estimé que la production halieutique en Tunisie a augmenté de 126 528 tonnes en 2016 à 130 298 tonnes en 2017 [22]. En 2020, 2 500 espèces tunisienne ont été répertoriées correspondant à 31% des espèces présentes en méditerranée.

De nos jours, les algues se caractérisent par leurs hautes valeurs nutritionnelles grâce à leurs richesses en différents type de biomolécules qui servent dans le développement économique de différentes industries, notamment en industrie agroalimentaire (hydrocolloïdes). De ce fait, des projets de différents instituts de recherche portent sur les activités biologiques des macroalgues, l'extraction de composés actifs, et leurs utilisations potentielles. Cela nécessite la caractérisation de leurs contenus en phycocolloïdes, en pigments (β -carotène et fucoxanthine), en lipides et en métabolites bioactifs, tout en démontrant leur potentielle valorisation afin de renforcer l'utilisation des macroalgues dans les « bioproduits ».

Comme explicité précédemment, les polysaccharides et les pigments issus des macroalgues constituent les familles de molécules les plus exploitées et qui attirent de plus en plus l'attention en raison de leurs diversités structurales et leurs potentiels biologiques (activités pharmacologique, antivirale, immunostimulante, antitumorale, antidiabétique, antioxydante, etc.).

En 2023, le diabète en Tunisie se positionne parmi les cinq pathologies dominant les causes de mortalité : il s'agit d'un problème majeur de santé publique, caractérisé également de problème économique (Rejaibi et al., 2022). De ce fait, de nombreuses études visent à développer de nouveaux médicaments, incluant des agents hypoglycémiant oraux tels que la metformine, l'acarbose, la sitagliptine, l'insuline et ses analogues (Dahlén et al., 2022). Toutefois, il a été prouvé que la plupart d'entre eux présentait une certaine toxicité et des effets secondaires (Kroschinsky et al., 2017). Il est donc nécessaire aujourd'hui de proposer des alternatives aux molécules actuelles afin de répondre aux besoins de santé, tant en termes de quantité que de qualité. Les composés bioactifs de macroalgues se révèlent être des pistes intéressantes et efficaces afin d'atteindre ces objectifs de lutte contre le diabète de type 2 (Magwaza et al., 2023).

Les réserves actuelles des combustibles fossiles ne sont pas suffisantes pour répondre à la demande énergétique croissante et tendent s'épuiser. La pollution, le réchauffement climatique et l'inflation des prix du pétrole ont conduit à développer des alternatives énergétiques, si possible renouvelables. Les macroalgues gagnent en popularité en tant que source renouvelable viable et prometteuse pour la production de biocarburants. De nombreuses recherches ont été menées pour accéder au potentiel des macroalgues afin de valoriser divers co-produits d'extractions de molécules à hautes valeurs ajoutés, comme les vecteurs énergétiques. L'existence de glucides et lipides, dans les macroalgues ou leurs co-produits, combinée à l'absence de lignine, sont des atouts à l'utilisation des macroalgues en tant que matière première pour la production de biocarburants.

Les deux aspects (DT2 et énergie) cités ci-dessus, loin d'être exhaustifs, démontrent le potentiel qu'ont les macroalgues comme matrice biologique pouvant contribuer à la résolution de problèmes sanitaires, énergétiques et même géopolitiques. Au regard de la diversité des macroalgues et de leurs quantités en Tunisie, de nombreux défis biotechnologiques sont à challenger afin d'installer des filières d'industrialisation et de valorisation des macroalgues dans le pays. Les objectifs nombreux de ces travaux de thèse visaient à apporter des éléments

de réponse à ces problématiques, en particulier concernant le potentiel biotechnologique et biologique d'hydrocolloïdes et de pigments extraits de la macroalgue brune *H. scoparia*. Ce travail a permis d'étudier leurs propriétés antidiabétique, antioxydante, anticoagulante, anti-inflammatoire, antivirale, antibactérienne ou encore élicitrice. Le potentiel d'utilisation des polysaccharides extraits comme agents texturants a également été investigué tout comme la possibilité d'utiliser la macroalgue ou des co-produits d'extraction pour générer des vecteurs énergétiques (H₂, bio-éthanol, bio-diesel). Pour terminer, l'inventaire de ces propriétés physico-chimiques et biologiques a été rapportée à l'étude structurale, plus ou moins fine, de chacune des molécules extraites dans ces travaux (fucoïdane (FHS), alginate (AHS), fucoxanthine (P-FX), β-carotène (P-CT)). Les résultats sont présentés sous la forme de trois chapitres (trois articles avec une introduction courte) en rapport avec les éléments cités précédemment, puis l'ensemble des résultats sont discutés dans une partie dédiée.

- **Chapitre 1 : Caractéristiques structurales, propriétés physico-chimiques et biologiques des polysaccharides hydrosolubles extraits de l'algue brune tunisienne *H. scoparia*.**

- **Chapitre 2 : Production et purification des fucoxanthines et du β-carotènes de *H. scoparia* et leurs effets sur des enzymes digestives et quelques bactéries pathogènes.**

- **Chapitre 3 : Bioconversion de l'algue brune tunisienne *H. scoparia* : Application à l'énergie.**

CHAPITRE 1 :

Caractéristiques structurales, propriétés physico-chimiques et biologiques des polysaccharides hydrosolubles extraits de l'algue brune tunisienne *H. scoparia*

ARTICLE 1:

Farah hadjkacem^{1,2}, Jihen Elleuch¹, Meriem Aitouguinane³, Fatma Chakou⁴, Alina Violeta Ursu², Pascal Dubessay², Nathalie Bourgougnon⁴, Mounir Traikia⁵, Didier Le Cerf⁶, Zainab El Alaoui-Talibi³, Cherkaoui El Modafar³, Zakaria Boual⁷, Mohamed Didi Ould El Hadj⁷, Cédric Delattre^{2,8}, Philippe Michaud², Imen Fendri⁹, Slim Abdelkafi¹, Guillaume Pierre^{2,*} (2023). Primary structural features, physicochemical and biological properties of two water-soluble polysaccharides extracted from the brown Tunisian seaweed *Halopteris scoparia*.

Le monde marin est capable d'offrir un nombre infini de molécules originales en raison de sa diversité et sa complexité. Un des enjeux de la recherche actuelle est l'exploration de la biodiversité marine en vue de son exploitation. Ainsi, l'étude de la biodiversité marine, et plus particulièrement des polysaccharides marins, suscite un intérêt considérable pour diverses applications en biotechnologies. Les macroalgues constituent par exemple une source de nombreux hydrocolloïdes dont les applications sont nombreuses en alimentaire ou dans la formulation de produits cosmétiques et nutraceutiques. Ces organismes marins sont classés, en fonction de leurs contenus en pigments, en algues brunes, vertes et rouges (Wijesinghe et al., 2012). Les macroalgues brunes produisent des pigments dont les chlorophylles *a* et *c*, les carotènes et de xanthophylles (voir Section I.3.).

Chaque macroalgue possède des polysaccharides matriciels prédominants ayant des structures caractéristiques de l'espèce. Les polysaccharides extraits des macroalgues brunes sont principalement les alginates, les fucoïdanes et les laminarines.

Les fucoïdanes sont formés d'un squelette de résidus α -(1,3)-L-fucose ou d'une alternance de L-fucp liés en α -(1,3) et α -(1,4) parfois associés avec d'autres monosaccharides et des groupements sulfate en position *O*-2, *O*-3 et/ou *O*-4 des résidus fucp. Les alginates sont constitués d'acides β -D-mannuronique et α -L-guluronique liés en (1,4) ayant des conformations pyranosiques, disposées soit en bloc homogène (MM ou GG), soit en bloc hétérogène (MG ou GM) (Priyanka et al., 2022), conduisant à une grande diversité de structures, de masses molaires et de propriétés physico-chimiques.

Plusieurs activités biologiques ont été décrites pour les fucoïdanes, tandis que les applications des alginates se sont limitées essentiellement aux domaines alimentaire et médical en tant qu'agents épaississant, émulsifiant, stabilisants ou encore comme additifs dans certains produits pharmaceutiques (Wijesinghe et al., 2012).

Les côtes tunisiennes sont caractérisées par leur richesse et leur diversité en espèces macroalgales. En fait, les études taxonomiques de la flore macroalgale, réalisées en Tunisie, ont abouti à l'identification de 405 espèces distinctes dont 250 *Rhodophyta*, 72 *Chlorophyta* et 83 *Phaeophycées* (Feldmann, 1931 ; Meñez and Mathieson, 1981 ; Ben Maiz et al., 1987). Toutefois, d'autres espèces restent encore non identifiées à l'heure actuelle (Ktari et al., 2021). Il a été rapporté que la diversité de ces organismes marins diminue du nord au sud, 84% des espèces signalées étant reportées au Nord (**Figure 68**) (Ktari et al., 2021).

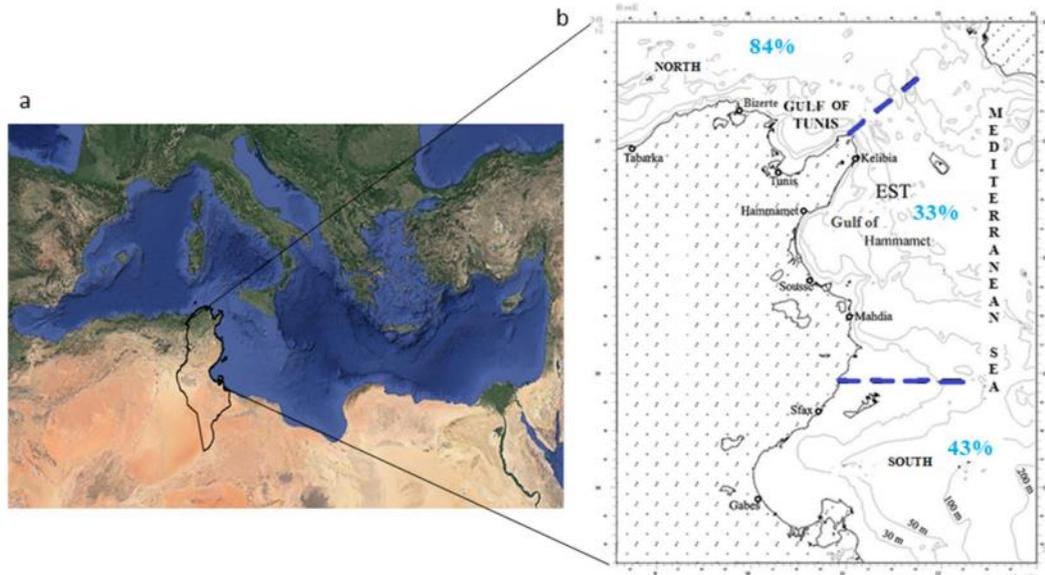


Figure 68. Position géographique de la Tunisie (a) (source : Google Earth), (b) Les pourcentages de la biodiversité macroalgale relative aux trois régions : côte nord, côte est et côte sud.

Ces macroalgues ont besoin d'être préservées et si éventuellement valorisées. En fait, l'exploitation de la filière de macroalgues en Tunisie est très peu développée. Elle repose principalement sur l'exploitation de la matière brute (Smichi et al., 2022). Ainsi, au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'exploitation des polysaccharides extraits d'une macroalgue brune abondante sur les côtes Nord de la Tunisie.

Nous avons réussi l'identification moléculaire de la macroalgue. Des analyses *in silico* ont été menées afin de définir trois marqueurs moléculaires discriminants, à savoir le gène codant pour l'ARN18S, pour la grande sous-unité ribosomique (LSUr Dna) et pour la grande sous-unité du la rubisco (Rbcl). Ainsi, des couples d'amorces spécifiques ont été y conçus pour permettre l'amplification de ces marqueurs. Après amplification par PCR, les amplicons obtenus ont été clonés et séquencés. L'analyse des séquences ainsi obtenues a montré que la macroalgue de cette étude est affiliée au genre *Halopteris* et à l'espèce *scoparia*. Notons que ce travail a permis le **dépôt de données d'identification et de caractérisation** dans la base de données NCBI, GenBank Database sous les numéros d'accès OK646025.1 et OK646131.1.

Nous nous sommes intéressés dans ce chapitre au développement de procédés d'extraction de deux polymères, les fucoïdanes et les alginates, à partir de la matière séchée des thalles d'*H. scoparia*. L'extraction des fucoïdanes passe par une étape de dépigmentation et délipidation de la matière sèche de macroalgue, suivie par un traitement acide par HCl suivies

par plusieurs précipitations éthanoliques. L'extraction des alginates, a nécessité également un traitement alcalin afin de générer des formes sodiques des alginates (alginates de sodium). La caractérisation des polysaccharides et l'étude de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques sont indispensables pour corrélérer leurs structures à de potentielles applications. Ainsi, la composition biochimique globale en sucres totaux, oses neutres, oses acides, protéines et groupements sulfates des deux fractions a été déterminée par des dosages colorimétriques. Afin d'affiner cette caractérisation, des analyses par IRTF ont été effectuées afin de pré-identifier les groupements fonctionnels caractéristiques des alginates (fraction AHS) et des fucoïdanes (fraction FHS), à savoir respectivement les acides ManA/GulA et le rapport M/G, i.e. <1) et les groupements sulfate (7,26%). Des analyses par CPG/MS-IE ont permis de déterminer la composition en monosaccharides des fucoïdanes. Les résultats obtenus suggèrent que les fucoïdanes extraits d'*H. scoparia* sont des galactofucoïdanes avec un rapport Fuc/Gal de l'ordre de 2,4, partiellement contaminés par des alginates (9,72%). L'analyse des alginates par RMN, notamment ^1H et ^{13}C , a permis de confirmer la structure des alginates et de déterminer précisément leur rapport M/G et les motifs d'enchainements des homo- et hétéro-blocs. Le spectre RMN- ^1H de AHS a révélé la présence de trois assignations : (i) $\text{H}_{\text{G}-1}$ (5,53 ppm), (ii) $\text{H}_{\text{M}-1} + \text{H}_{\text{GM}-5}$ (5,13 ppm) et (iii) $\text{H}_{\text{G}(\text{GG}-5\text{G})-5}$ (4,92 ppm) classiquement décrites dans la littérature. Ainsi, nous avons montré la présence des signaux correspondant au proton anomérique de l'acide guluronique (G-1) à 5,53 ppm (signal I) et de l'acide guluronique $\text{H}_{-5(\text{GG}-5\text{G})}$ à 4,92 ppm (signal III). Tandis que le signal II correspond au chevauchement entre le proton anomérique de l'acide mannuronique (M-1) et le C-5 des blocs (GM-5), qui a été identifié à 5,13 ppm (Torres et al., 2007). Les valeurs des blocs F_{GG} , F_{MM} , F_{GM} (ou F_{GM}) ont été évalués à 0,45, 0,29 et 0,29, respectivement, ceci indiquant que AHS est composé de 26% de ManA et 74% de GulA (Torres et al., 2007). Le rapport M/G des alginates est d'environ 0,35. Les résultats ont montré également que la fraction AHS est probablement capable de former un gel rigide puisque le rapport M/G est inférieur à 1. Les valeurs de $\text{M/G} < 1$ et $\eta = 1.5 > 1$ démontrent d'ailleurs la richesse de la fraction AHS en blocs homopolymères GG. Une analyse par CPG/SM-IE a été menée pour identifier les liaisons O-glycosidique en générant des AAPM de la fraction FHS uniquement, sans toutefois donner de résultats concluants. Une caractérisation physico-chimique SEC-MALS a permis de déterminer les caractéristiques macromoléculaires en régime dilué de FHS et AHS afin d'appréhender leurs comportements en solution. Ainsi, nous avons pu déterminer pour chaque polymère la masse molaire moyenne en poids (Mw), en nombre (Mn), le rayon de giration (Rg), le rayon dynamique (Rh) et la viscosité intrinsèque $[\eta]$.

Les résultats obtenus ont montré que les alginates extraits d'*H. scoparia* sont composés majoritairement par des oses acides (soit 53%) avec une masse molaire de $2,18 \times 10^5$ g/mol alors que les fucoïdanes sont formés essentiellement par des oses neutres riches en groupements sulfate (7,26%), ayant une masse molaire est de $8,14 \times 10^5$ g/mol. Une étude des propriétés rhéologiques des alginates a été effectuée (les fucoïdanes ne présentant que peu de capacité à modifier la mobilité de l'eau en régimes semi-dilué et concentré) afin de corrélérer leurs comportements en solution avec les données structurales et les grandeurs macromoléculaires mesurées.

Enfin, diverses propriétés biologiques des fucoïdanes et des alginates ont été évaluées en rapport avec des activités détaillées dans la littérature (voir Sections II.4.1. et II.4.2.) concernant ces deux macromolécules, à savoir leurs activités antioxydante, antibactérienne, anti-inflammatoire, anticoagulante, antivirale, antidiabétique et élicitrice (amélioration des défenses naturelles chez des plantules de tomates). Les polysaccharides FHS et AHS présentent des activités antioxydantes. FHS a montré une activité antiradicalaire avec une CI_{50} d'environ 1,1 mg/mL, ce qui était inférieur aux valeurs des CI_{50} de l'acide ascorbique qui est de l'ordre de 200 µg/mL. A une concentration de 2 mg/mL, FHS a révélé une capacité antioxydante de 76,66%, en utilisant le test DPPH. En plus, à une concentration de 2 mg/mL, l'AHS présentait un maximum d'activité antiradicalaire de 35,8% sans atteindre une valeur de CI_{50} . Les pouvoirs chélateurs des ions ferreux présentés par FHS et AHS augmentent de manière dose-dépendante et présentent des valeurs d'environ 76% et 62,47% à une concentration de 2 mg/mL, plus basses que celles enregistrées pour l'EDTA (99,31%). L'activité chélatante d'AHS représente une CI_{50} d'environ 0,2 mg/mL. La réduction du complexe Fe^{3+} /ferricyanure par FHS et AHS était de l'ordre de 0,135 et 0,89 respectivement à 2 mg/mL. L'activité réductrice de l'AHS à A_{700} était de l'ordre de 0,89, résultat inférieur à l'activité réductrice de l'acide ascorbique aux mêmes concentrations. Les activités de piégeage contre superoxyde d'anion de FHS et AHS étaient quant à elles d'environ 13,94% et 11,22%, respectivement à une concentration de 2 mg/mL. Enfin, les activités de piégeage du radical hydroxyle OH pour FHS et AHS étaient de l'ordre de 64% et 10%, respectivement. Ces résultats ont montré le potentiel des fucoïdanes extraits d'*H. scoparia* en tant que composé naturel piègeur de radicaux hydroxyles OH. Par ailleurs, AHS a présenté des activités de piégeage similaires à l'activité de piégeage de l'acide ascorbique. FHS et AHS sont capables d'inhiber la dénaturation de protéines (témoin BSA) avec des valeurs de CI_{50} d'environ 1 mg/mL par rapport au diclofénac (3 mg/mL). Les fractions ont ainsi présenté des activités anti-inflammatoires significatives. En parallèle, des investigations ont été menées

sur l'effet anticoagulant du FHS et de l'AHS en mesurant l'activité de la prothrombine et le temps de thromboplastine partielle activée. En effet, après traitement avec FHS, le taux de prothrombine diminue de 100% à 0,625 mg/mL à 25,3% à une concentration de 10 mg/mL et le temps de céphaline activé augmente de 61,7 s à 150 s à des concentrations entre 0,625 et 10 mg/mL alors que le traitement avec AHS est similaire à celui de l'héparine et présente un taux de prothrombine qui se maintient presque à 100%, avec un temps de céphaline activé de l'ordre de 27 s dans une plage de concentration de 0,625 mg/mL à 10 mg/mL.

Les activités inhibitrices de l' α -amylase se sont avérées plus fortes avec l'extrait FHS que AHS (78,89% contre 70,64% à 2 mg/mL). Cependant, l'alginate semble être un puissant inhibiteur de l'activité α -amylase avec une CI_{50} de l'ordre de 0,1 mg/mL. Ces deux polymères montrent une inhibition significative de l'activité de la trypsine, avec des valeurs plus fortes pour AHS au regard de données décrites dans la littérature (CI_{50} d'environ 0,4 mg/mL).

FHS et une version hydrolysée (FHS_h) ont confirmé le potentiel des fucoïdanes comme antiviraux, avec des concentrations effectives CE_{50} de l'ordre de $19,44 \pm 0,36$ et $27,84 \pm 1,61$ μ g/mL respectivement pour une MOI de 0,001 DI_{50} /cellules. Ces polymères présentent des activités cytotoxiques contre le virus Herpes simplex, similaires à des doses classiquement utilisées de Zorivax (inférieures à 200 μ g/mL).

Cette étude contribue enfin à démontrer l'utilisation des alginates et des oligo-alginates comme sources naturelles pour améliorer les défenses naturelles des plantes (élicitation). Par rapport aux polymères d'alginates, les oligo-alginates (oligo-4h et oligo-8h) ont démontré une capacité élicitrice efficace dans l'accumulation des polyphénols et l'amélioration de l'activité PAL élevé dans les feuilles des plantules de tomates de l'ordre de $3,57 \pm 0,25$ et $3,86 \pm 0,39$ μ g d'acide gallique/g de FW, en comparaison avec le témoin, ou encore AHS ($p < 0,0001$) qui n'augmente pas l'activité PAL dans les feuilles (7 μ mol/mg de prot/h/mg de FW). A l'inverse, l'utilisation de l'AHS a conduit à l'élévation non seulement des teneurs en polyphénols mais aussi de l'activité PAL dans les racines des plantules de tomates, de l'ordre de $27,35 \pm 3,3$ μ mol/mg de prot/h/mg de FW, par rapport aux fractions oligo-alginates ($8,78 \pm 1,6$ et $14,43 \pm 2,2$ μ mol/mg de prot/h/mg de FW) ou encore le contrôle.

Les résultats ainsi obtenus sont **en faveur de l'exploitation des polysaccharides de *H. scoparia*** dans divers domaines biologiques ; et en particulier celui des antiviraux (fucoïdanes) et éliciteurs des défenses naturelles des plantes (alginates). Un travail beaucoup plus fin concernant les relations entre ses fonctions et les structures identifiées serait important pour compléter l'étude

ARTICLE 1

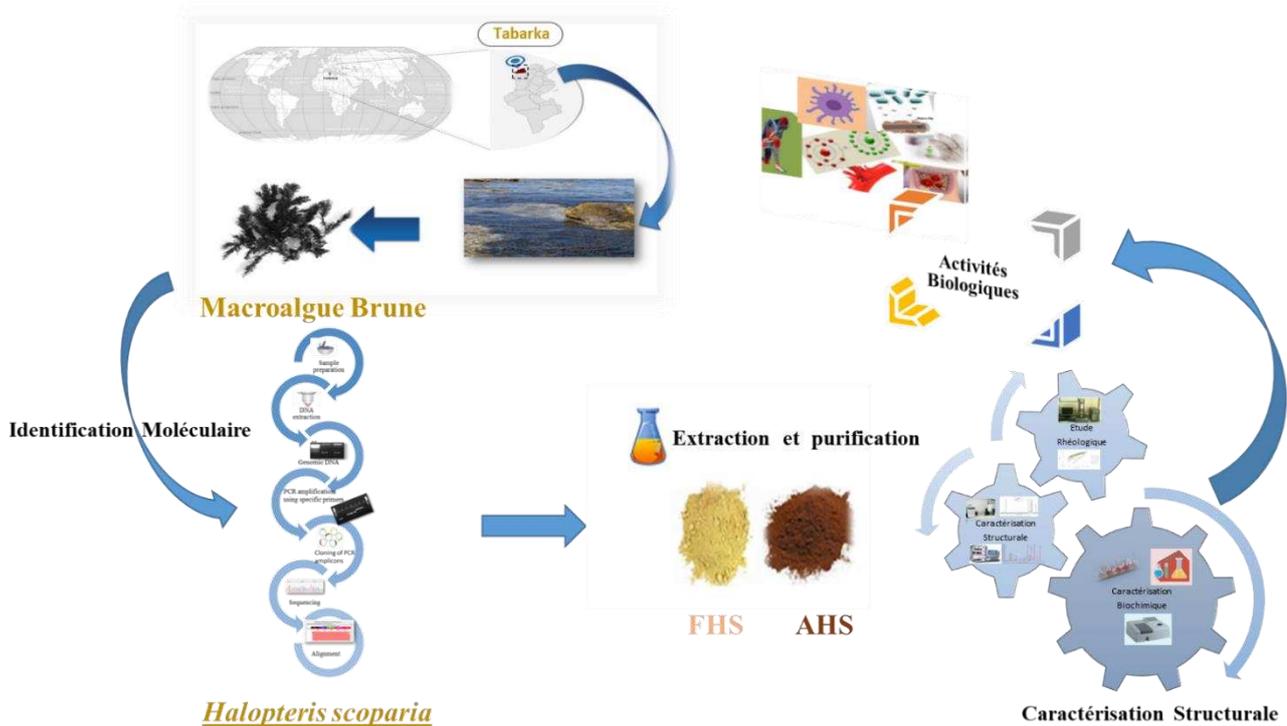
Primary structural features, physicochemical and biological properties of two water-soluble polysaccharides extracted from the brown Tunisian seaweed *Halopteris scoparia*.

Farah hadjkacem^{1,2}, Jihen Elleuch¹, Meriem Aitouguinane³, Fatma Chakou⁴, Alina Violeta Ursu², Pascal Dubessay², Nathalie Bourgougnon⁴, Mounir Traikia⁵, Didier Le Cerf⁶, Zainab El Alaoui-Talibi³, Cherkaoui El Modafar³, Zakaria Boual⁷, Mohamed Didi Ould El Hadj⁷, Cédric Delattre^{2,8}, Philippe Michaud², Imen Fendri⁹, Slim Abdelkafi¹, Guillaume Pierre^{2,*}

International Journal of Biological Macromolecules

Article soumis

IF₂₀₂₃ = 8.025



International Journal of Biological Macromolecules

Primary structural features, physicochemical and biological properties of two water-soluble polysaccharides extracted from the brown Tunisian seaweed *Halopteris scoparia* --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Carbohydrates, Natural Polyacids and Lignins
Keywords:	- Halopteris scoparia; polysaccharides; biological activities
Corresponding Author:	Guillaume Pierre AUBIERE Cedex, France
First Author:	Farah Hadjkacem
Order of Authors:	Farah Hadjkacem Jihen Elleuch Meriem Aitouguinane Fatma Chakou Alina Violeta Ursu Pascal Dubessay Nathalie Bourgougnon Mounir Traikia Didier Le Cerf Zainab El Alaoui-Talibi Cherkaoui El Modafar Zakaria Boual Mohamed Didi Ould El Hadj Cédric Delattre Gwendoline Christophe Philippe Michaud Imen Fendri Slim Abdelkafi Guillaume Pierre
Abstract:	Marine algae are the most abundant resource in the marine environment and are still a promising source of bioactive compounds including hydrocolloids. This study contributes to the evaluation of the biological and biotechnological potentials of two water soluble polysaccharides, namely alginates (AHS) and fucoidan (FHS), extracted and purified from <i>Halopteris scoparia</i> , an abundant Tunisian brown macroalgae collected in Tunisia (Tabarka region). The total sugars, neutral monosaccharides, uronic acids, proteins, polyphenols, and sulfate groups contents were quantified for both fractions, as well as their functional groups and primary structural features by Fourier transform infrared spectroscopy, ionic and/or gas chromatography and nuclear magnetic resonance analyses. AHS and FHS showed significant anti-inflammatory ($IC_{50} \approx 1$ mg/mL), anticoagulant (e.g., 27-61.7 for the activated partial thromboplastin time), antihyperglycemic (0.1-40 μ g/mL) and anti-trypsin ($IC_{50} \approx 0.3$ -0.4 mg/mL) effects. FHS and a hydrolyzed fraction showed a very promising potential against herpes viruses (HSV-1) ($IC_{50} < 28$ μ g/mL). Besides, AHS and two hydrolyzed fractions

1 **Primary structural features, physicochemical and biological properties of**
2 **two water-soluble polysaccharides extracted from the brown Tunisian**
3 **seaweed *Halopteris scoparia***

4
5 **Farah Hadjkacem^{1,2}, Jihen Elleuch¹, Meriem Aitouguinane³, Fatma Chakou⁴, Alina**
6 **Violeta Ursu², Pascal Dubessay², Nathalie Bourgougnon⁴, Mounir Traikia⁵, Didier Le**
7 **Cerf⁶, Zainab El Alaoui-Talibi³, Cherkaoui El Modafar³, Zakaria Boual⁷, Mohamed Didi**
8 **Ould El Hadj⁷, Cédric Delattre^{2,8}, Gwendoline Christophe², Philippe Michaud², Imen**
9 **Fendri⁹, Slim Abdelkafi¹, Guillaume Pierre^{2,8*}**

10 ¹ Laboratoire de Génie Enzymatique et Microbiologie, Equipe de Biotechnologie des Algues,
11 Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Université de Sfax, 3038Sfax, Tunisia

12 ² Institut Pascal, Université Clermont Auvergne, CNRS, Clermont Auvergne INP, F-63000
13 Clermont-Ferrand, France

14 ³ Centre d'Agrobiotechnologie et Bioingénierie, Unité de Recherche Labellisée CNRST
15 (Centre AgroBiotech-URL-CNRST-05), Faculté des Sciences et Techniques Marrakech,
16 Université Cadi Ayyad, Marrakech 40000, Morocco

17 ⁴ Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, Université Bretagne Sud, Lorient, France

18 ⁵ Institute of Chemistry of Clermont-Ferrand, Clermont Auvergne University, CNRS, SIGMA
19 Clermont, 63000 Clermont-Ferrand, France

20 ⁶ Normandie Université, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, PBS, 76000 Rouen, France

21 ⁷ Laboratory for the Protection of Ecosystems in Arid and Semi-Arid Zones, Kasdi Merbah-
22 University, Ouargla 30000, Algeria

23 ⁸ Institut Universitaire de France (IUF), 1 Rue Descartes, 75005 Paris, France

24 ⁹ Laboratory of Plant Biotechnologies Applied to the Improvement of Plants, Faculty of
25 Sciences, University of Sfax, 3038 Sfax, Tunisia

26 * Correspondence: guillaume.pierre@uca.fr (G.P.); Tel.: +33 473 407 422

28 **Abstract**

29 Marine algae are the most abundant resource in the marine environment and are still a
30 promising source of bioactive compounds including hydrocolloids. This study contributes to
31 the evaluation of the biological and biotechnological potentials of two water soluble
32 polysaccharides, namely alginates (AHS) and fucoidan (FHS), extracted and purified from
33 *Halopteris scoparia*, an abundant Tunisian brown macroalgae collected in Tunisia (Tabarka
34 region). The total sugars, neutral monosaccharides, uronic acids, proteins, polyphenols, and
35 sulfate groups contents were quantified for both fractions, as well as their functional groups
36 and primary structural features by Fourier transform infrared spectroscopy, ionic and/or gas
37 chromatography and nuclear magnetic resonance analyses. AHS and FHS showed significant
38 anti-inflammatory ($IC_{50} \approx 1$ mg/mL), anticoagulant (e.g., 27-61.7 for the activated partial
39 thromboplastin time), antihyperglycemic (0.1-40 μ g/mL) and anti-trypsin ($IC_{50} \approx 0.3$ -0.4
40 mg/mL) effects. FHS and a hydrolyzed fraction showed a very promising potential against
41 herpes viruses (HSV-1) ($IC_{50} < 28$ μ g/mL). Besides, AHS and two hydrolyzed fractions were
42 able to stimulate the natural defenses of tomato seedlings, assessing their elicitor capacity, by
43 increasing the activity of phenylalanine ammonia-lyase (66-422%) but also significantly
44 changing the polyphenol content in the leaves (121-243%) and roots (30-104%) of tomato
45 plants.

46 **Keywords**– *Halopteris scoparia*, polysaccharides, biological activities

48 **1. INTRODUCTION**

49 Considering the growing exploitation of macroalgae in various applications, the global
50 macroalgae market has witnessed vast growth opportunities likely to increase by 2030. Between
51 1995 and 2012, the production of macroalgae increased by more than 176%, which is

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52 particularly true for *Phaeophyceae* (brown macroalgae) and Rhodophyceae (red macroalgae).
53 In 2014, the macroalgae market represented twenty-one million fresh tons of seaweed, 94%
54 coming from aquaculture. The global macroalgae could reach \$21.11 billion by 2023 with an
55 annual growth rate of 8.4%. Overall, red, and brown macroalgae, mainly *Porphyra*, *Laminaria*,
56 and *Undaria pinnatifida*, represent 99% of the global demand. These seaweeds are used as
57 marine food sources for humans and animals. In Europe, industrial use of marine macroalgae
58 is still limited to the colloid industries with a share of 75% for agars, carrageenan, and alginates
59 production [1]. Macroalgae have a wide variety of valuable molecules, often showing
60 interesting physico-chemical and/or biological properties, such as proteins, polysaccharides,
61 vitamins, pigments, and polyphenols. The recovery and characterization of such biomolecules
62 have thus significantly increased during the last decade, to make concrete and viable the
63 biorefinery of macroalgae. Primary and secondary metabolites, as well as other constituents of
64 seaweed are used in various fields, as instance energy, food, feed, cosmetic, nutraceutical or
65 pharmacology [2]. Today, some polysaccharides extracted from seaweeds are unlighted,
66 especially fucoidans and alginates which are sulfated and anionic carbohydrates which possess
67 wide-ranging beneficial therapeutic effects and health-promoting properties as anticoagulant,
68 anti-inflammatory, antiviral or antioxidant agents [3]. Overall, these polysaccharides are often
69 considered as biocompatible, non-toxic, and biodegradable.

70 *Phaeophyceae*, which belongs to Ochrophyta phylum, have been described for their capacity to
71 produce three types of polysaccharides (e.g., fucoidans, alginates and laminarins), as well as
72 some interesting pigments (e.g., fucoxanthins). The structural features of these polysaccharides
73 and their complexity depend on the seaweed, biotic and abiotic conditions, and the extraction
74 process. Fucoidans are composed of a main backbone of α -L-Fucp residues with other neutral
75 monosaccharides such as galactose, mannose, xylose, and uronic acids. They also contain
76 sulfate groups, of which the distribution pattern is variable. The sulfate and/or acetate groups

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

77 of fucosyl residues are mainly located at C-2, C-4 or less often at C-3 [4], but also in double
78 substitutions at the C-2 and C-4 positions. Note that several seaweeds belonging to *Laminaria*
79 order contain fucoidans having a linear backbone of α -(1,3)-L-Fucp residues. Yet, fucoidans
80 produced by Fucales order have a backbone with alternating L-Fucp residues linked in α -(1,3)
81 and α -(1,4) [5]. *Phaeophyceae* also contain alginates in their algal matrix source, which
82 participate in their flexibility and capacity to manage high salt concentrations [6]. Alginates are
83 linear anionic polymers, composed of random homo- and heteroblocks of β -D-ManA and α -D-
84 GulA residues linked in (1,4). Note that the M/G ratio and distribution pattern in MM, GG,
85 M/G blocks influence the physicochemical characteristics of alginates. Laminarin is a
86 polysaccharide composed by a β -(1,3) chain of 20 to 25 D-Glcp units, with sometimes some β -
87 (1,6) branches [7]. This polysaccharide can represent up to 35% (dw) of specific seaweeds.
88 There are two distinct types of laminarin, the M type which contains a mannitol molecule at its
89 reducing end and the G type without it [7].

90 Excluding the use of alginates in food and colloidal fields, which is quite common, these
91 polysaccharides can be used, as well as fucoidans, for their anti-diabetic properties, as
92 protecting agents for repairing cell damage in the pancreas, or as enhancer of insulin secretion
93 capacity. Alginates and fucoidans can constitute a barrier for glucose diffusion by increasing
94 the viscosity in solution and inhibit α -amylase activity, which could lead in carbohydrates
95 decomposition limitation [8]. Regarding their anti-inflammatory activities, fucoidans could
96 modulate inflammatory mediators and immune cells. They can also improve pro/anti-
97 inflammatory cytokine dysregulation. In addition, they can inhibit the production of nitric oxide
98 and tumor necrosis factor [9]. As previously cited, fucoidans, which could be considered as
99 glycosaminoglycan-like, are reported for their anticoagulant activity, even if they are less
100 significant than those reported for carrageenans and can thus be developed as alternative to
101 heparin [10]. Due to their contents in sulfate groups, fucoidans showed effective free radical

102 scavengers for protecting against oxidation damage in various biological systems [11].

103 Alginates and fucoidans have also been reported as natural plant defense stimulation agents,

104 e.g., against *Fusarium* diseases in olive trees and date palms cultures. Designing new fractions

105 composed of active oligo-alginates and oligo-fucoidans can thus lead to new green alternatives

106 for limiting the use of chemical phytosanitary products in the agriculture field [12]. It is

107 noteworthy that oligosaccharides prepared from ulvans, laminarins and carrageenans have also

108 been reported for enhancing plant defenses [13].

109 The 1 300 kms Tunisian coasts are characterized by their richness and diversity in macroalgal

110 species. These seaweeds need to be preserved and when possible valued. In fact, the macroalgae

111 sector in Tunisia is very underdeveloped. It is based on the use of the raw material. Nowadays,

112 Tunisia aims to develop the use of macroalgae in different fields, and especially the exploitation

113 of their polysaccharides for their wide ranges of biotechnological applications. *Halopteris*

114 *scoparia*, a Tunisian brown seaweed belonging to the Phaeophyceae species, is well distributed

115 on the north coast of Tunisia and is one example of an underused biological bioresources which

116 could be valued. This study focuses on two water-soluble polysaccharides (alginates and

117 fucoidans) extracted from *Halopteris scoparia* and provides an up-to-date overview of their

118 structural, their physicochemical and their various biological properties, in addition to their

119 potential health benefits. To our knowledge, this is the first time that a comprehensive study of

120 the structural features associated to various physico-chemical and biological properties have

121 been done for the alginates and fucoidans extracted from *Halopteris scoparia*, collected in

122 Tunisia. Overall, the seaweed was first identified by molecular engineering tools to assess its

123 genus and specie. Then, the alginates (AHS) and fucoidans (FHS) fractions have been extracted

124 by well-known procedures and structurally characterized by various methodologies, i.e.

125 colorimetric assays, infrared spectroscopy (IRTF), gas chromatography coupled to mass

126 spectrometry (GC/MS), ionic chromatography coupled to pulsed amperometric detection

127 (HPAEC-PAD), size exclusion chromatography coupled to multiple angle laser light scattering
128 (SEC-MALS) and 1-2D nuclear magnetic resonance (NMR). The rheological behavior of the
129 alginates as well as various biological activities for both AHS and FHS, i.e., antioxidant,
130 antiviral, anti-inflammatory, anti-coagulant, antibacterial, antidiabetic and elicitation, have
131 been investigated.

2. Materiel and Methods

2.1. Biological material and chemicals

134 The brown seaweed was harvested from Tabarka (Tunisia) (36° 57' 36.223" N and 8° 45'
135 12.018" E) in February 2020 then dried using a drying oven for 20 days at 50°C ± 2°C. The
136 dried materials were crushed into powder with a mechanical Blender [14]. All chemicals were
137 from Sigma-Aldrich.

2.2. Molecular identification

2.2.1. DNA extraction

140 Two g of fresh macroalgae were ground in liquid nitrogen then 1 mL of 2% (w/v) CTAB
141 (Cetyltrimethyl ammonium bromide) buffer composed of (Tris-HCl (1M, pH = 7), NaCl (5M),
142 CTAB 16%, EDTA (250mM, pH=7)) and 40 µL of proteinase K (20 mg/mL) were added. The
143 mixture was incubated at 60°C for 1 h in a dry bath. The sample was transferred into microtubes
144 containing silica beads and subjected to agitation using a high-speed vortex for 5 min to enhance
145 mechanical cell lysis. After the lysis step, the mixture was centrifuged (1 000 x g for 30 s at
146 4°C. Then, 700 µL of supernatant were transferred to a new tube (without silica beads) and
147 extracted with 800 µL of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) followed by a second
148 extraction with 800 µL of chloroform-isoamyl alcohol (24:1). The aqueous phase was
149 recovered, and genomic DNA was then precipitated by adding 0.1 volume of sodium acetate
150 solution (3M, pH 5.3) and two volumes of ice-cold pure ethanol. After incubation overnight at

151 -20°C, the precipitated DNA was pelleted by centrifugation (12 000 x g for 30 min at 4°C). The
152 pellet was washed using ethanol 70 % then dried in a vacuum centrifuge. DNA was rehydrated
153 in 40 µL of ultrapure water with agitation for 2 h at room temperature. The DNA quality and
154 integrity were tested by agarose gel electrophoresis. DNA concentration and purity were
155 controlled by spectrophotometry. The concentration of DNA was calculated from 260 nm
156 absorbance according to the Lambert-Beer law. The 260/280 ratio was used as the purity
157 indicator of the DNA samples (an optimum value for 260/280 ratio for pure DNA is 1.8).

2.2.2. DNA Amplification, Cloning and Sequencing

160 The molecular identification of the harvested macroalgae was carried out using specific primers
161 designed after an *in-silico* study of the loci associated with three nuclear markers, i.e., 18S
162 rDNA, ITS rDNA region, LSUr and a chloroplast marker, the *rbcl* gene. The PCR reactions
163 were carried out in a thermocycler (T100 thermal cycler, Biorad, France) in a reaction volume
164 of 50 µL, consisting of 5 µL of 10x buffer, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄,
165 1% (v/v) Triton X-100 and nuclease solution (1 mg/mL), 1 µL of dNTP (0.25 mM), 1 µL of
166 each primer (0.5 pmol), 1 µL of genomic DNA (100 ng), 1 µL of Pfu DNA polymerase (1U).
167 The amplifications were conducted according to the following cycling parameters: 1/ 95°C for
168 3 min followed by 58°C for 1 min, 2/ 30 cycles 72°C for 2 min., 95°C for 30 s, 58°C for 30 s
169 and 3/ 72°C for 5 min.

170 The PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel. Each purified PCR
171 product was ligated into the pGEM7Zf (Promega) linearized with *Sma*I generating a
172 recombinant plasmid. The obtained recombinant plasmids were then transformed into
173 competent *Escherichia coli* DH5α (Promega) bacteria. The recombinant plasmid DNA from
174 transformed bacteria were isolated using the Nucleobond Xtra Kit (Qiagen) according to the
175 manufacturer's instructions. The sequencing of the various cloned markers was conducted

176 using a taq DyeDeoxy terminator cycle Sequencing kit and a 3 700 ABI Prism DNA sequencer
177 (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) according to the manufacturer's instructions.
178 The obtained sequences were compared with the sequences available in GenBank using the
179 BLAST server from the NCBI website (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). To show the
180 phylogenetic relationships of the studied macroalgae and closely related taxa, evolutionary
181 analyses were conducted using Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version X (MEGA-
182 X). Phylogenetic trees were constructed using neighbor-joining and maximum likelihood
183 methods implemented in MEGA X. Bootstrap values are shown on nodes in percentages of 1
184 000 replicates.

185 **2.3.Extraction of hydrocolloids from *Halopteris scoparia***

186 **2.3.1. Depigmentation and delipidation**

187 Fifty g of *H. scoparia* powder have been macerated in 700 mL of acetone (twice) for 24 h at
188 room temperature under constant stirring at 450 rpm in a mechanical paddle stirrer. After
189 filtration of the depigmented mass using a sintered glass with porosity 3 (16-40 μm), the
190 depigmented biomass has been subjected to a second maceration in 300 mL of methanol (twice)
191 for 24 h at room temperature with constant stirring at 450 rpm in the same mechanical paddle
192 stirrer. After filtration of the depigmented and delipidated biomass under vacuum on a fritted
193 glass of porosity number 3 (16-40 μm), the obtained biomass was dried in an oven at 50°C [15].

194 **2.3.2. Fucoidans extraction from *H. scoparia***

195 The extraction and purification of the fucoidans were conducted according to Ermakova et al.
196 [15]. with few modifications. Twenty-five g of the delipidated dried macroalgae (from Section
197 2.3.1.) were treated with 500 mL of HCl (0.1 M) for 2 h at 60°C under continuous stirring at
198 450 rpm. The supernatant was collected after filtration on a fritted glass of porosity number 3
199 (16-40 μm) and successive centrifugations were performed (5 000 x g for 10 min at 20°C). The
200 mixture was subjected to three cycles of alcoholic precipitations using cold absolute ethanol at

201 a ratio 3:1 (v/v) to recover polysaccharides. After centrifugations at (8 000 x g, 10 min, 4°C),
202 the obtained precipitate was then dissolved in ultrapure water (30 g/L). The solution was then
203 dialyzed using dialysis tubes (Snakeskin, 3.5 kDa MWCO, 35 mm dry Martini I.D) against
204 ultrapure water for 3 days with regular changes of water and an evaluation of the salinity [15].
205 The desalinated solution was finally freeze-dried and named “FHS” corresponding to the
206 fraction enriched in fucoidans extracted from *H. scoparia*.

2.3.3. Alginate extraction from *H. scoparia*

208 The sodium alginates from *H. scoparia* were obtained according to Davis et al. [16], with few
209 changes. Twenty-five g of algal biomass previously delipidated, depigmented, and treated twice
210 with HCl (0.1M), were washed with ultrapure water and treated with 500 mL of Na₂CO₃
211 solution (3% (m/v), pH=11) under constant stirring (450 rpm) at 60° C for 2 h to get the
212 alginates in their sodium salts form. After centrifugation (10 000 x g, 15 min, 4°C), the collected
213 supernatant was precipitated with 3 volumes of cold absolute ethanol (100 %) for 15 min. The
214 obtained precipitate was recovered after centrifugation (12 000 x g for 30 min at 4°C), dissolved
215 in 300 mL of ultrapure water then acidified by adding HCl (6 M) to promote the precipitation
216 of alginic acid at a pH ranging from 1.5 to 3. After several successive centrifugations (5 000 x
217 g for 20 min at 4°C), the pellet was dissolved in 200 mL of ultrapure water and neutralized (pH
218 = 7.5) using a NaOH solution (1 M). The sodium alginate solution was again precipitated by 3
219 volumes of cold absolute ethanol (100%) at -20°C for 15 min, then the mixture was centrifuged
220 (12 000 x g for 30 min at 4°C) [15]. The pellet was dissolved in ultrapure water at 50 g/L before
221 freeze-drying. This fraction was called “AHS” and was thus enriched in sodium alginates.

2.4. Global biochemical compositions

223 The global compositions for both FHS and AHS were characterized by colorimetric assays,
224 i.e., the total carbohydrates, neutral sugars, uronic acids, proteins, phenolic compounds, and
225 sulfate contents. Briefly, the total carbohydrates composition was determined at $\lambda = 485$ nm by

226 using the method of Dubois et al. [17]. D-Glc being the standard. The neutral sugars content
227 was determined thanks to the method of Monsigny et al. [18], at $\lambda = 450$ nm, using D-Glc as
228 standard. The content in uronic acids was quantified owing to the procedure of Blumenkrantz
229 et al. [19], at $\lambda = 520$ nm, using both D-GlcA and D-Glc as standards. Note that the correction
230 method of Montreuil et al. [20] was used to drop the interferences due to the possible presence
231 of neutral monosaccharides during the determination of the uronic acid contents. The proteins
232 content was checked at $\lambda = 595$ nm thanks to the method of Bradford et al. [21], using bovine
233 serum albumin (BSA) as standard. The concentration of the sulfate groups was measured using
234 the turbidimetric method (BaCl₂/gelatin) described by Dodgson et al. [22] at $\lambda = 535$ nm, with
235 potassium sulfate (K₂SO₄) as standard. The total content in phenolic compounds was quantified
236 at $\lambda = 750$ nm, according to the method of Folin-Ciocalteu, using gallic acid as standard [23].
237 The NaCl concentration and the conductivity of the two fractions AHS and FHS were estimated
238 using a conductimeter (Hach, sensION™+ EC7).

2.5.ATR-FTIR footprints

240 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) was carried out using a VERTEX 70 FT-IR
241 instrument equipped with an ATR A225 module (palladium-diamond). The absorbed infrared
242 radiation by polysaccharides is expressed as a function of extremely specific wavelengths which
243 are characteristic of the nature and conformation of the polysaccharide and its constituent
244 bonds. The IR spectra of FHS and AHS (50 scans) were obtained at room temperature (blank:
245 air in a controlled atmosphere, 20 scans), in the spectral range 4000-400 cm⁻¹, after correction
246 for background noise, H₂O/O₂/CO₂ ratios, and smoothing (level 13), using OPUS 7.2 software
247 (Bruker Optik GmbH, 3D, CHROM, IR and PRO package). The spectra were analyzed using
248 the same software and the results were exported for plotting on Origin 8.5.1 software SR2
249 (OriginLab).

250

2.6. Composition in monosaccharides by GC/MS-EI analyses

Prior to the analysis of trimethylsilylated monosaccharides using gas chromatography coupled to mass spectrometry with an electronic impact (GC/MS-EI), 15 mg of PS (FHS and AHS) were hydrolyzed in 1.5 mL of an aqueous solution of 2 M trifluoroacetic acid (TFA) for 90 min at 120°C under stirring (1 200 rpm). In addition, obtained hydrolysate was then subjected to evaporation under nitrogen stream and derivatives monosaccharides were done according to the protocols described by Pierre et al. [24]. A volume of 1.5 mL of pyridine/ BSTFA: TMCS (99:1) (1/1 v/v) solution prepared and then added to the dry residues. Furthermore, the mixture is left under stirring (1 200 rpm) for 2 h at room temperature. The solution is then evaporated to dryness under nitrogen stream at the same conditions as described above. The trimethylsilyl-O-glycosides are finally dissolved in dichloromethane (10 g/L). The same procedure was repeated using standard monosaccharides (Man, Glc, Ara, Rha, Rib, Fuc, Xyl, Fru, ManA, Gal, GlcA and GalA). Samples were analyzed using Shimadzu Nexus GC-2030 coupled with GCMS-QP2020NX (Shimadzu, Japan) and monosaccharides derivatives were precisely injected to an OPTIMA-1MS column (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm) from Macherey-Nagel with hydrogen flow of 1.75 mL/min and pression of about 7.8 psi). The first temperature was set at 100°C for 2.75 min, followed by a first rise of 8.40°C/min to 200°C and a second rise of 5.20°C/min to 215°C which was held for 0.95 min. The ionization was carried out by electron impact (EI, 70 eV). The trap temperature was set at 150°C, the target ion was set at 40-800 m/z and the injector temperature was set at 250°C. Relative molar proportions were calculated using area normalization method. The data were analyzed using MestReNova 14.3.1-31739 software (Mestrelab Research, Spain).

2.7. Composition of monosaccharides and MG/ratio by HPAEC-PAD analyses

Ten mg of AHS were subjected to an acidic hydrolysis (as well as the standards, i.e., glucose, galactose, mannose, arabinose, fucose, xylose, rhamnose, ribose, glucuronic acid, galacturonic

276 acid) using TFA (2M) for 90 min at 120°C. The obtained products were then neutralized with
277 an ammonia solution (35%) and centrifuged (14 000 x g for 15 min at 4°C). The obtained
278 supernatants were filtered on a filter (0.22 µm). First, the chromatographic column was
279 equilibrated using NaOH (18 Mm) for 15 min. Then, 25 µL of the samples were injected into a
280 thermostated column (CarboPac PA1 (Dionex Corporation, 4 x 250 mm) at 25°C and a flow
281 rate of 1 mL/min. The injected samples were eluted with an isocratic gradient for 30 min using
282 NaOH (18 Mm), followed by a linear gradient of sodium acetate dissolved in NaOH (200 Mm)
283 for 20 min, then by a final gradient composed of 100% sodium acetate (1 M) in NaOH solution
284 of 200 mM for 20 min. Finally, the system was washed using NaOH (200 mM) for 15 min and
285 then re-equilibrated with NaOH (18 mM) for 7 min. The identification and quantification of
286 neutral sugars and uronic acids were figured out by comparing their retention time and using
287 the calibration curves obtained from the standards, previously prepared in the same
288 experimental conditions. All the data were analyzed with Chromeleon software (version 6.8)
289 [25].

2.8. NMR spectroscopy analyses

291 AHS was dissolved two times in 1 mL D₂O (99.9%, v/v) and then freeze dried to substitute
292 protons present in the extract with deuterium. Prior to analysis, the sample was re-dissolved in
293 D₂O (40g/L). The NMR spectra was analyzed at 80°C for AHS, at 353 K using a 500 MHz
294 Bruker (AVANCE III HD) spectrometer equipped with a 5 mm Bruker probe (¹H/¹³C/¹⁵N) and
295 a z-gradient coil probe. The ¹H NMR spectra were acquired using a ZG sequence and 128 scans
296 were collected. The pulse width was 9.7 µsec, the relaxation time was 4 s, and the acquisition
297 time was 3.3 s. The ¹³H NMR spectra were acquired using a ZGPG sequence and 128 scans
298 were also collected. The pulse width was 12 µsec, the relaxation time was 2 s, and the
299 acquisition time was 1.20 s.

300 The distributions of Gula and ManA in AHS (F_G and F_M), homogeneous (F_{GG} and F_{MM}) and
 1
 2 301 heterogeneous (F_{GM} and F_{MG}) blocks of AHS were calculated after analysis of ^1H spectra and
 3
 4 302 signals I, II and III, according to the method described by Grasdalen et al. [26] by using the
 5
 6
 7 303 following set of Eq 1-6:

$$F_G = \frac{A_I}{(A_{II}+A_{III})} \quad \text{Eq.1}$$

$$F_{GG} = \frac{A_{III}}{(A_{II}+A_{III})} \quad \text{Eq.2}$$

$$F_M = 1-F_G \quad \text{Eq.3}$$

$$F_{GM} = F_{MG} = F_G-F_{GG} \quad \text{Eq.4}$$

$$F_{MM} = F_M-F_{MG} \quad \text{Eq.5}$$

$$M/G = F_M/F_G = \frac{1-F_G}{F_G} \quad \text{Eq.6}$$

306 2.9. Macromolecular characteristics by HPSEC-MALS analyses

307 Size exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering (SEC/MALS) was
 40
 41
 42 308 used to characterize, in dilute regime, the following macromolecular parameters, i.e., the
 43
 44 309 molecular weight (M_n), the weight average molecular weight (M_w), the polydispersity index
 45
 46
 47 310 (Đ), the gyration radius (R_g) and the intrinsic viscosity $[\eta]$. The molecular characteristics of
 48
 49 311 both FHS and AHS were thus evaluated by HPSEC-MALS (HELEOS II, Wyatt Technology
 50
 51
 52 312 Corp). The apparatus was composed of three detectors: (i) a light scattering detector equipped
 53
 54 313 with a He-Ne laser ($\lambda = 690 \text{ nm}$) (Wyatt Technology Corp., Heleos II), (ii) a differential
 55
 56
 57 314 refractometer (DRI) (Shimadzu, RID10A) and (iii) a viscometer (Wyatt Technology Corp.,
 58
 59 315 Viscostar II). The samples were dissolved at 0.2 g/L in 0.1 M in LiNO_3 for 24 h under stirring

1
2 316 (750 rpm) at room temperature and 100 μ L at 0.2 g/L were then injected onto the columns. The
3 317 samples were eluted through two columns in series (OHPAK SB-G guard column,
4 318 OHPAKSB806 and 804 HQ columns (Shodex)). The elution was carried out at 0.7 mL/min
5
6 319 with a solution of LiNO₃ (0.1 M) at 0.5 mL/min. The Dn/Dc was fixed at 0.15mL/g. Note that
7
8 320 the solvent was filtered (Millipore Filters, 0.1 μ m), degassed and filtered through a 0.45 μ m
9
10 321 column (Filters Millipore, 0.45 μ m) before elution. The collected data were analyzed using
11
12 322 Astra 6.1 software package.
13
14
15

16 323 **2.10. Determining the rheological behavior of AHS**

17 324 The rheological measurements were studied using a rheometer (TA Instruments, AR200,
18
19 325 France) equipped with a cone-plane geometry (40mm) with a Gap of 54 microns and equipped
20
21 326 with a control system of temperature. For the flow measurements of AHS, the solutions were
22
23 327 prepared at concentrations ranging from 0.5% to 2.5% (m/v) in ultrapure water and in various
24
25 328 other saline solutions, i.e. NaCl (0.1M) NaCl (0.5M), KCl (0.1M), KCl (0.5M) and CaCl₂ (5
26
27 329 mM, 10 mM and 20 mM), then stirred (400 rpm) for 72 h at 4° C. Seven hundred μ L were
28
29 330 carefully loaded between the two plates and the excess of fluid was removed to ensure fluid
30
31 331 interface. A thin layer of hexadecane was carefully used for coating the periphery of the system,
32
33 332 and thus limiting the evaporation of the samples. The temperatures for measuring the apparent
34
35 333 viscosity were set at 20°C, 25°C, 40°C and 60°C. The shear stress as well as the viscosity (η)
36
37 334 were checked at shear rates ($\dot{\gamma}$) ranging from 10⁻² to 10² s⁻¹. All the data were collected and
38
39 335 analyzed using the TA Rheology Advantage Data Instrument Analysis Package.
40
41
42
43

44 336 For the rheological characterization of AHS in oscillatory mode, the solutions were prepared in
45
46 337 the same conditions and concentrations as previously explained and analyzed with the same
47
48 338 apparatus. The deformation measurements were carried out at 25°C over a frequency ranging
49
50
51 339 from 0.01 to 100 rad.s⁻¹ allowing the determination of the G' and G'' moduli as well as the
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

340 viscoelastic modulus after calculation of $\tan(G''/G')$. All the data were collected and analyzed
1
2 341 using the same software.
3

342 **2.11. Biological activities**

343 **2.11.1. Antioxidant activities**

344 **2.11.1.1. DPPH radical-scavenging activity**

345 The free radical scavenging efficiency of DPPH was evaluated using 2,2-diphenyl-1-
13
14 346 picrylhydrazyl (DPPH) at $\lambda = 517$ nm as described by Delattre et al. [27], using ascorbic acid
15
16 347 as positive control. The % inhibition of DPPH was estimated using the following equation. The
17
18
19 348 scavenging efficiency of DPPH radicals was expressed in IC_{50} which stands for the
20
21
22 349 concentration of polysaccharides at which the inhibition rate reaches 50%. Note that the
23
24 350 experiments were carried out in triplicate.
25

$$26 \text{ DPPH Inhibition (\%)} = 1 - \frac{(A_{\text{sample}} - A_0)}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad \text{Eq.7}$$

27
28
29
30 351
31
32
33 352
34 353
35
36
37 354 *Where A_{sample} : absorbances at $\lambda = 517$ nm of 1 mL of sample (0-2 g/L) with 1 mL of DPPH (0.1*
38
39 355 *mM) while and A_{control} is the absorbance at $\lambda = 517$ nm of 1 mL of distilled water with 1 mL of*
40
41 356 *0.1 mM DPPH in ethanol and A_0 is the absorbance of 1 mL of sample (0-2 g/L) with 1 mL of*
42
43
44 357 *ethanol.*
45

358 **2.11.1.2. Ferric reducing power**

359 The reducing power was estimated at $\lambda = 700$ nm according to Yan et al. [28] using ascorbic
50
51 360 acid as positive control. The absorbances of the samples were function of their concentrations.
52
53
54 361 The high absorbance corresponded to high reducing power. Note that the experiments were
55
56 362 carried out in triplicate.
57

363 **2.11.1.3. Ferrous ion-chelating power**

364 The chelation capacities of ferrous ions by FHS and AHS were determined at $\lambda = 562$ nm
1
2 365 according to Carter et al. [29], using EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) as positive
3
4 366 control. The ferrous chelating activity was estimated according to the above equation. The
5
6
7 367 experiments were carried out in triplicate.

$$\text{Ferrous ion chelation (\%)} = \left(\frac{(A_{\text{control}} - (A_0 - A_{\text{sample}}))}{A_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad \text{Eq.8}$$

14 368
15 369
16 370
17 371
19 372 *Where A_0 is the absorbance of the sample (0-2g/L) with ferrozine at $\lambda = 562$ nm, A_{sample} is the*
20
21 373 *absorbance of the sample (0-2g/L) (without Ferrozine) and finally A_{control} corresponding to*
22
23
24 374 *absorbance of all reagents in the absence of sample.*

2.11.1.4. Scavenging of hydroxyl radical activity

26 375
27
28 376 The hydroxyl radical scavenging activity was quantified at $\lambda = 510$ nm according to [27], using
29
30
31 377 ascorbic acid as positive control. The rate of hydroxyl radical inhibition was calculated using
32
33
34 378 Eq 9. The experiments were carried out in triplicate.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad \text{Eq.9}$$

40 379
41
42 380 *Where A_{sample} : absorbance at $\lambda = 510$ nm of 0.2 mL of sample (0-2 g/L) with 0.4 mL of solution*
43
44
45 381 *of FeSO_4 (5 mM) and H_2O_2 (1%, m/m) and A_{control} : absorbance at $\lambda=510$ nm of 0.2 mL of*
46
47 382 *distilled water with 0.4 mL of solution of FeSO_4 (5 mM) and H_2O_2 (1%, m/m).*

2.11.1.5. Scavenging of superoxide anion activity

51
52 384 The superoxide anion scavenging activity was measured at $\lambda = 325$ nm according to Zhao et al.
53
54 385 [30], using ascorbic acid as positive control. The percentage of radical inhibition of the
55
56
57 386 superoxide anion was calculated using Eq 10. The experiments were carried out in triplicate.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad \text{Eq.10}$$

Where A_{sample} is the absorbance at $\lambda = 325 \text{ nm}$ of 0.420 mL of the sample (0-2 g/L) with 0.450 mL of Tris-HCl (pH 8.2; 50 mM) and with 30 μL of pyrogallol (5 mM) and 0.1 mL of ascorbic acid (5%, m/v) whereas A_{control} is the absorbance of 0.420 mL of distilled water with 0.450 mL of Tris-HCl (pH 8.2; 50 mM) and with 30 μL of pyrogallol (5 mM) and 0.1 mL of ascorbic acid (5%, m/v).

2.11.2. Anti-inflammatory activity

The anti-inflammatory activity was measured following the protocols of Osman et al. [31] with slight modifications. It allowed determining the ability of both FHS and AHS to inhibit the denaturation of a control protein (bovine serum albumin, BSA), induced by heat (70°C). FHS, AHS and diclofenac extracts (positive control) were prepared at concentrations ranging from 1 to 10 g/L (m/v). Briefly, 1 mL of each extract (or control) was added to 1 mL of BSA solution (0.2%, m/v) previously prepared in Tris-HCl (pH 6.6). After incubation at 37°C for 20 min, followed by a second incubation at 70°C for 10 min, still in a water bath, the samples were cooled, and the turbidity was measured at $\lambda = 660 \text{ nm}$. The inhibition of albumin denaturation was calculated according to Eq 11. The tests were carried out in triplicate.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \left(\frac{D}{C} \right) \right) \times 100 \quad \text{Eq. 11}$$

Where D : absorbance of the tested solution at $\lambda = 660 \text{ nm}$ and C : absorbance of the negative control (absence of BSA inhibitor) also measured at $\lambda = 660 \text{ nm}$.

2.11.3. Anticoagulant activity

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
409 The anticoagulant activities of FHS and AHS were determined using the activated partial
410 thromboplastin time (APT) as well as the prothrombin level (PT) tests. These experiments were
411 carried out using a coagulometer (Behnk Elektronik, Thrombotimer 2, serial number 412129).
412 Citrated normal human plasma according to the manufacturer's specifications (Biolabo sas,
413 France) was used during the experiments, obtained from the blood of healthy anonymous
414 subjects, without treatment, aged from 25 to 45 years. The samples were taken by venipuncture
415 and the blood was mixed with trisodium citrate solution (3.8%, m/v), and centrifuged (2 400 g,
416 20 min) to obtain platelet-depleted plasma. Citrated plasma was collected and stored at -80°C
417 until use. The activated partial thromboplastin time (APT) was a test for studying the
418 functioning of the intrinsic pathway while the prothrombin time (PT) dedicated to studying the
419 functioning of the extrinsic pathway. FHS and AHS stock solutions were prepared at a
420 concentration of 10 mg/mL in distilled water [32]. Serial dilutions were carried out to carry out
421 the experiments described in the following sections.

31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65

2.11.3.1. Prothrombin time test

423 The prothrombin time test reflects the overall efficiency of the extrinsic system. It is sensitive
424 to the variations in factors V, VII and X, levels and to factor II (prothrombin). The clotting time
425 is determined at 37°C in the presence of tissular thromboplastin and calcium. Thus, the
426 prothrombin time measured can be converted into prothrombin time or International
427 Normalized Ratio (INR). Briefly, 90 µL of plasma were mixed with 10 µL of polysaccharide
428 solution (from 0.625 mg/mL to 10 mg/mL). Two hundred µL of thromboplastin reagent (TP)
429 were added to the mixture. The clotting time was then recorded using the coagulometer and the
430 results were expressed as prothrombin time (PTQ in s). The PT was converted into %
431 prothrombin and the corresponding INR was calculated using a conversion table described in
432 the study of Yoon et al. [32].

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{Quick time}_{\text{sample}}}{\text{Quick time}_{\text{normal mean}}} \right)^{\text{ISI}} \quad \text{Eq.12}$$

2.11.3.2. Activated Partial Thromboplastin Time (APTT)

This screening can identify deficiencies in factors VIII, IX, XI and XII. The TCA test allows the recalcification of plasma by calcium chloride in the presence of quantity of cephalin and a factor XII activator (kaolin). Briefly, 90 μL of plasma were introduced into each tube as well as 10 μM of polysaccharides (AHS or FHS) solutions at concentrations ranging from 0.625 mg/mL to 10 mg/mL. After incubation for 2 min at 37°C, 100 μL of TCA reagent were added and incubated for 2 min at 37°C. Finally, 100 μL of CaCl_2 solution (0.025 M) were added to the mixture. The clotting time was recorded using a KC1A coagulometer (Thrombotimer “Behnk electronics”) [33].

2.11.4. Antiviral activity

2.11.4.1. Cellular culture

African green monkey kidney cells (Vero cell line no. ATCC CCL81) were cultured in Eagle's minimum essential medium (MEM, Eurobio Laboratory) supplemented with 8% (v/v) fetal calf serum (FCS), to which was previously added 1% (v/v) of PCS (Penicill 10000 U, colimycin 25000 U, streptomycin 10 mg). The cells were systematically revealed every 3 days.

2.11.4.2. Preparation of Herpes simplex viruses

Herpes simplex virus stocks were prepared by incubating Vero monolayers in 75 cm^2 culture flasks seeded with 350000 cells/mL and incubating at 37°C, in an atmosphere containing 95% air and 5% CO_2 (v/v). Two or three days after infection, the cultures were frozen and thawed twice. Then, low-speed centrifugations were performed to remove cell debris. The obtained supernatant was stored at -70°C until its use. Virus assays were performed by the dilution method of Ramakrishnan et al. [34], using 96-well microtiter plates. Virus count was estimated

1
2 457 from cytopathogenicity and expressed as infectious doses at 50% per milliliter ($2 \times 10^{7.4}$
3 458 ID₅₀/mL).

4 459 **2.11.4.3. Study of cytotoxicity and antiviral activity by neutral** 5 6 7 460 **red dye method**

8
9 461 Fifty μ L of AHS or FHS were prepared in Eagle's MEM supplemented with 8% FCS and
10
11 462 dispensed into 96-well plates (Nunclon, Intermed). One series included eight assays ranging
12
13 463 from extreme drug concentrations of 500, 200, 50, 10, 5 to 1 μ g/mL (4 wells per concentration).
14
15 464 One hundred μ L of cell suspension (3.5×10^5 Vero cells/mL) in Eagle MEM containing 8%
16
17 465 FCS were dispensed into the wells using a Titertek® multichannel pipette and infected with
18
19 466 HSV-1. Fifty μ L of simulated virus-infected cell suspensions at a multiplicity of infection
20
21 467 (MOI) of 0.001 ID₅₀/cells were then transferred to each well containing the polysaccharides and
22
23 468 incubated for 3 days without changing the medium, at 37 °C with 5% of CO₂. Cells and virus
24
25 469 controls were simultaneously run. After microscopic examination, to check the virus growth,
26
27 470 50 μ l of neutral red dye (0.15%, pH 5.5) were added to each well and the cultures were
28
29 471 incubated for 45 min at 37°C [35]. The excess of dye was removed by rinsing with phosphate
30
31 472 buffer at pH 7.2 (Biomérieux) and neutral red was incorporated by viable cells and then eluted
32
33 473 with 100 μ L/well of citrate buffer. After shaking the plate for 20 min, monolayers were
34
35 474 destroyed, and the absorbances of the wells were measured with a multichannel
36
37 475 spectrophotometer (Packard Spectra Count™) at $\lambda = 540$ nm. The absorbance was related to
38
39 476 the percentages of viable cells which were inversely proportional to the CPE ratio. The
40
41 477 regression line was determined for each test and for each plate based on cell controls (0% CPE)
42
43 478 and viral controls (100% CPE) [36]. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) of the compound
44
45 479 was defined as the concentration which reduced the absorbance of infected cells to 50% in
46
47 480 comparison to the negative control. The effective antiviral concentration at 50% (EC₅₀) was
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

481 expressed as the concentration which allows the protection of 50% of infected cells calculated
1
2 482 by the following–equation:
3

$$EC_{50}(\%) = \frac{[(ODt)HSV - (ODc)HSV]}{[(ODc)MOCK - (ODc)HSV]} \times 100 \quad \text{Eq. 13}$$

4
5
6
7

8
9 483 Where *(ODt)HSV* is the absorbance of the polysaccharide solution, *(ODc)HSV* is the
10
11 484 absorbance of the virus-infected control (absence of sample) and *(ODc)MOCK* is the
12
13 485 absorbance of the control (Mock infection). The ratio of *(ODc)HSV* to *(ODc)MOCK* is
14
15
16 486 expressed as “% control”.

18 487 **2.11.5. Elicitor activity of AHS**

21 488 **2.11.5.1. Depolymerization of sodium alginates and preparation** 22 23 489 **of oligo-alginates**

24
25 490 Free radical hydrolysis was carried out using hydrogen peroxide as a depolymerizing agent
26
27
28 491 using an adapted procedure from Bouissil et al. [37]. AHS was dissolved in distilled water at
29
30 492 10 g/L and stirred for 2 h at 70°C to improve its solubility. Briefly, 2.85 mL of H₂O₂ (35%,
31
32
33 493 m/m) were added to 50 mL of alginate solution at a concentration of (2% (m/v)) (ratio 1/1,
34
35 494 m/m). The mixture was then incubated for 6 h at 60°C with stirring (500 rpm), and 5 mL were
36
37
38 495 taken every hour. The reaction was stopped by adding 100% ethanol (in a 1/10, v/v ratio), with
39
40 496 gentle stirring for 1 h at room temperature. The samples were finally lyophilized, re-dissolved
41
42
43 497 in distilled water (80 mg/mL), and washed several times against ethanol (100%). The different
44
45 498 obtained fractions (ASH-h1 and ASH-h2 at various times) were prepared in distilled water,
46
47
48 499 lyophilized, and stored at 4°C before use.

50 500 **2.11.5.2. Plant cultivation and elicitation test**

51
52 501 Campbell 33 type tomato seeds were used. The seeds were placed individually in 17 cm pots
53
54
55 502 containing a germination substrate. Two weeks after germination, the seedlings were placed in
56
57 503 plastic grow bags (22 × 10 × 8 cm) containing a mixture of soil and peat (v/v). The plants were
58
59
60 504 cultivated in growth chambers at 26°C following a cycle of 16 h/8 h (light/dark). After 45 days

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

505 of germination, the elicitation was carried out by injection using a syringe, in the internodal
506 medium of the tomato plants, 20 μ L of each oligosaccharide solution previously prepared at a
507 concentration of 3 g/L in distilled water (pH = 6). An injection of only distilled water served as
508 a control. Eight tomato plants, at least 50 cm in height and possessing eight organized leaves,
509 were collected after injection, at various times 0, 12, 24, 72 and 120 h. Two apical leaves of
510 each tested plant were also cut, frozen in liquid nitrogen, crushed with a mortar and then stored
511 at -20°C for later analysis [38]. All experiments were carried out in triplicate.

2.11.5.3. Extraction and measurement of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity

514 Thirteen mg of tomato leaf powder were weighed and macerated in 2 mL of extraction buffer
515 composed of Tris-HCl (100 mM, pH 7), 2-mercaptoethanol (14 mM) and
516 polyvinylpolypyrrolidone solution (PVPP) (3%, m/v). The mixture was centrifuged (10 000 \times
517 g, 30 min, 4°C) (Universal 320 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany)
518 and the supernatant was collected, to which 200 μ L of an enzymatic extract, prepared
519 extemporaneously (1 mL of Tris-HCl (100 Mm, pH = 6) and 200 μ L of L-phenylalanine (20
520 Mm)). The reaction was carried out at 30°C for 30 min and stopped by the addition of 100 μ L
521 of HCl solution (6 M). The PAL activity was estimated by measuring the trans-cinnamic acid
522 synthesized at $\lambda = 290$ nm, with $\epsilon = 9116$ M⁻¹.cm⁻¹ [39].

2.11.5.4. Extraction and quantification of total phenolic compounds

525 Twenty mg of leaf powder were mixed with 2 mL of acetone (80% (v/v)). The samples were
526 incubated in ultrasonic bath for 30 min at 4°C. Then, the extracts were centrifuged (10 000 \times g,
527 15 min, 4°C). Two hundred μ L of the acetone extract were taken and added to the mixture
528 containing 250 μ L of Folin-Ciocalteu reagent and 500 μ L of sodium carbonate (20%, m/v).
529 The samples were incubated at 40°C for 30 min [40]. To avoid the interaction of possible non-

530 phenolic substances, another assay was carried out by adding 3% (m/v) of PVPP
531 (Polyvinylpolypyrrolidone) to the phenolic extract. After agitation and centrifugation (10 000
532 × g, 15 min, 4°C), the obtained supernatant was treated according to the same procedure as
533 above. The absorbance was measured at $\lambda = 760$ nm. The difference between the first (without
534 PVPP) and the second measurement (with PVPP) was calculated to determine the amount of
535 total phenolic compounds (gallic acid equivalent $\mu\text{g/g}$ of FP).

2.11.6. Antidiabetic activity

2.11.6.1. Inhibition of α -amylase

538 The method of Bernfeld has been used to determine α -amylase inhibitory activity [41]. For
539 enzyme preparation, porcine pancreatic amylase was dissolved in distilled water at 4°C to reach
540 a concentration of 4 U/mL while 0.5% (m/v) of starch was dissolved in a solution composed of
541 20 mmol/L of phosphate buffer (pH = 6.9) and 6.7 mmol/L of sodium chloride. Forty μL at 2
542 mg/mL of FHS or AHS were mixed with 400 μL of the starch solution and 160 μL of distilled
543 water. Two hundred μL of the enzymatic solution (4 U/mL) were added at the beginning of the
544 reaction, then the mixture was incubated for 3 min at 25°C. Two hundred μL of the mixture
545 were taken and then transferred to a glass tube containing 100 μL of a previously prepared DNS
546 solution (96 mmol/L of 3,5-dinitrosalicylic acid mixed with 5.31 mol/L of sodium tartrate and
547 of potassium in 2 mol/L of NaOH). Then, the mixture was incubated at 85°C for 15 min, diluted
548 by adding 900 μL of distilled water. The absorbance was measured at $\lambda = 540$ nm. Acarbose
549 was used as a positive control. The α -amylase inhibitory activity was estimated by using Eq 14.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad \text{Eq. 14}$$

550 Where A_{control} and A_{sample} : absorbances of the control and of the sample at $\lambda = 540$ nm.

2.11.6.2. Trypsin inhibition

552 The enzymatic activity was measured according to Kunitz et al. [42]. Fifty μL of trypsin
553 solution (2 mg/mL, prepared in Tris-HCL buffer (0.1 M, pH 8)) was pre-incubated for 30 min

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

with 100 μ L of AHS or FHS solutions initially dissolved in distilled water at a concentration of 2 mg/mL. After that, 0.5 ml of casein solution (1%, m/v, prepared in Tris-HCl buffer (0.1M, pH 8)) was added and the mixture was incubated at 37°C for 30 min. The reaction was stopped by adding 0.5 ml of trichloroacetic acid (TCA, 0.44 M). This mixture was centrifuged (5 000 x g, 20 min, room temperature) and the absorbance was measured at $\lambda = 280$ nm. The inhibitory activity was calculated using Eq 15.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 15}$$

Where A_{control} and A_{sample} : absorbances of the control and the sample at $\lambda = 280$ nm.

2.12. Statistical analysis

Three replicates were performed for all the experiments to calculate the standard deviation. The significant difference between the control and the treatment (****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01 and *p < 0.05) were measured using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test, and Graph Pad Prism (version 8.0.1). In all cases, the statistical significance has been accepted at p < 0.05 level.

3. Results and discussion

3.1. Molecular identification

The collected marine macroalgae was morphologically identified as being of *Halopteris* genus during the harvest. A molecular identification had been performed, based on molecular markers amplification, cloning and sequencing, to assess its specie, by using comprehensive taxonomy-based identification. DNA barcoding, which is considered as a fast and accurate method, was used. It does not require whole-genome sequences, only short stretches of DNA sequences constructed from the standard marker regions of the whole genome. The extracted DNA were successfully amplified using different primers (18S, LSU, RbcL). The PCR amplification

578 products (Supplementary data, Fig. S1) were purified and sequenced. The comparison of the
 579 obtained sequences with those reported in the NCBI database confirmed that the collected
 580 seaweed is affiliated to the *Halopteris* genus and *scoparia* specie. In fact, the blast results
 581 showed an identity percentage greater than 99% with *H. scoparia*. In parallel, the obtained
 582 sequences and those of reference strains were used to construct a similarity tree using the Mega
 583 X software (Supplementary data, Fig. S2). Regarding to the phylogenetic tree reconstruction
 584 results based on 18 S marker (Fig. S2), *Halopteris scoparia* is related to *Halopteris filicina*,
 585 with an 89% bootstrap value. Additionally, the phylogenetic tree reconstruction results based
 586 on LSU marker (supplementary data) showed that *Halopteris scoparia* is linked to *Halopteris*
 587 *pseudospicata* with a bootstrap score of 80%. Finally, the phylogenetic tree reconstruction
 588 results of Rbcl marker (supplementary data) proved that *Halopteris scoparia* is intricately
 589 linked to *Halopteris filicina* with a 98 percent bootstrap value. *Halopteris scoparia* seems to be
 590 incorporated on the phylogenetic tree, indicating that it is genetically closed to *Halopteris*
 591 *filicina* and homolog of other *Halopteris* genus determined by NCBI-BLAST and that it shares
 592 morphological traits. Overall, the application of DNA barcodes using 18S, LSU and rbel
 593 markers has successfully allowed to identify *Halopteris scoparia* seaweed, harvested from
 594 Tabarka. Those three markers were adequate to accurately distinguish *Halopteris scoparia* from
 595 other species (e.g., *H. filicina*). Note that these data have been uploaded on NCBI, GenBank
 596 Database (OK646025.1 and OK646131.1).

3.2. Structural characterization of *H. scoparia* fucoidans (FHS and AHS)

3.2.1. Extraction yield and chemical composition

The extraction yields and composition of FHS and AHS are given in Table 1.

Table 1. Global composition of the fucoidan (FHS) and alginate (AHS) fractions.

	Yields (% w/w)	Proteins (% w/w)	Sulfates (% w/w)	Phenolic compounds (% w/w)	Total sugars (% w/w)	Neutral acids (% w/w)	Uronic acids (% w/w)	Conductivity (μ s/cm)	[NaCl] eq. (g/L)
FHS	1.6	0.26 \pm 0.09	7.26 \pm 0.3	1.24 \pm 0.12	78.87 \pm 0.8	64.35 \pm 1.2	9.72 \pm 0.3	19.34	10.39

AHS	12	1.40 ± 0.04	5.96 ± 0.53	0.01 ± 0.2	67.04 ± 1.3	20.05 ± 1.6	53.01 ± 3.5	16.02	8.82
-----	----	-------------	-------------	------------	-------------	-------------	-------------	-------	------

1 601
2
3 602
4
5
6 603
7
8 604
9
10
11 605
12
13 606
14
15
16 607
17
18 608
19
20
21 609
22
23 610
24
25 611
26
27
28 612
29
30 613
31
32
33 614
34
35 615
36
37 616
38
39
40 617
41
42 618
43
44
45 619
46
47 620
48
49
50 621
51
52 622
53
54
55 623
56
57 624
58
59 625
60
61
62
63
64
65

The extraction yield of FHS was significantly low, 1.16% (w/w), but consistent with values obtained from *Laminaria japonica* or *Saccharina longicuris* [43,44]. Yet, other authors found higher yields of fucoidans from the brown macroalgae *Undaria pinnatifida* (8.8%) and *Chorda filum* (10.5 %) [45]. FHS was composed of carbohydrates (78.87%), mainly neutral (64.35%) with some sulfated groups (7.26%) and contained minor amounts of protein (0.26%) and polyphenols (1.24%). The level in sulfate groups is consistent with the sulfate contents reported for fucoidans extracted from *Undaria pinnatifida* (7%), *Sargassum siliquosum* (5%) or *Sargassum fusiforme* (3.81%). The presence of uronic acids (9.72%) was like the composition of fucoidans extracted from *C. compressa* (8.65%) and could come from a contamination by alginates or other uronic acids involved in the backbone structure of FHS, as previously observed by Hentati et al. [46]. Regarding the literature, the different yields, and compositions of fucoidans from various brown macroalgae were related to the type of seaweeds, the extraction procedure, and the season/reproductive cycle [46].

The extraction yield of AHS was close to 12% (w/w), in the range of those reported for alginates extracted from other Tunisian brown seaweed like *C. barbata* (9.9%) [47] or from *C. sedoides* (11%) [48]. Yet, it is still low regarding values, around 53%, which have been reported, for instance, for *Durvillaea antarctica*. AHS contained around 67% of carbohydrates, mainly composed of uronic acids (53.01%), minor amounts of proteins (1.24%) and traces of phenolic compounds (0.01%). Regarding to literature, these results agreed with the results described for some alginates extracted from *Fucus spiralis* [49] or *Bifurcaria bifurcata* [37]. The level in uronic acids was like those published for *C. compressa* or *C. barbata* [6; 41]. Note that neutral sugars (20%) have been found in AHS, suggesting a contamination of the fraction, probably by fucoidans. Overall, this variability in the extraction yields of alginates depends on the type of seaweed as well as the extraction process [6].

626

3.2.2. ATR-FTIR footprints of FHS and AHS

1
2
3 627 FT-IR analyses were used to identify the main functional groups composing both for FHS and
4
5 628 AHS fractions. The FHS spectrum (Fig. 1A) was like those published for fucoidans extracted
6
7
8 629 from *C. compressa* or *U. pinnatifida* [14]. The strong absorption band observed at 3355 cm^{-1}
9
10 630 was assigned to (O-H) stretching vibrations from carbohydrates and water. The absorption
11
12
13 631 signal at 1631 cm^{-1} was assigned to ester groups stretching vibration of acid residues [50]. This
14
15 632 signal confirmed the presence of a weak concentration of uronic acids in FHS. The band at 1420
16
17
18 633 cm^{-1} corresponded to the stretching of the (CH_2) groups of the main monosaccharides (Gal and
19
20 634 Xyl) but also the (CH_3) groups of the fucosyl units [51]. In addition, the signal observed at 1223
21
22 635 cm^{-1} revealed the asymmetric stretching vibration of sulfate esters [52], while the bond around
23
24
25 636 1029 cm^{-1} represented the stretching vibration of polysaccharides. The peak at 825 cm^{-1} could
26
27 637 correspond to the presence of (C4-O-S) stretching of C-4 axial sulfate groups of fucosyl units
28
29
30 638 [53].
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

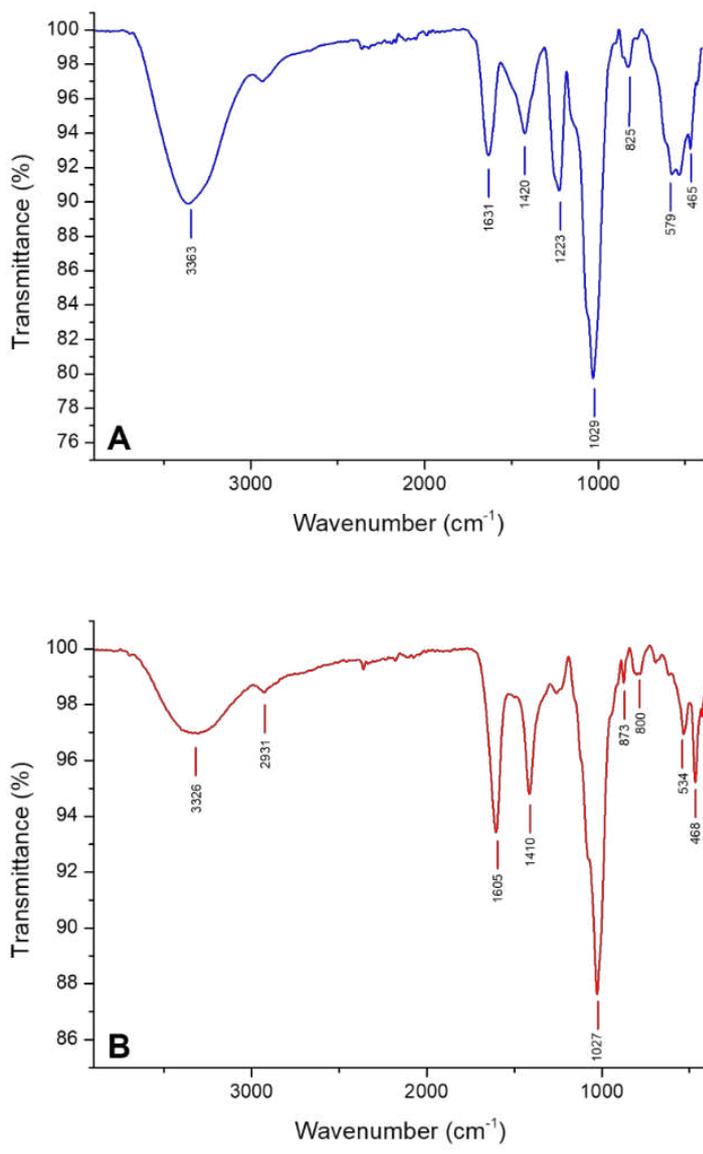


Fig. 1. FTIR footprints of FHS (A) and AHS (B) fractions.

The AHS spectrum (Fig. 1B) was compared to commercial alginates (data not shown) as well as a sodium alginate extracted from *C. barbata* [6]. The signals at 3259 cm⁻¹ and 2920 cm⁻¹ corresponded to the hydroxyl stretching vibration and the asymmetric vibration of carboxyl groups of uronic acids and residual water (O-H) [54]. In addition, the peak at 1410 cm⁻¹ represented the stretching vibrations of symmetrical carboxylate groups (COO⁻) whereas the

band at 605 cm⁻¹ was assigned to asymmetrical carboxylate groups (COO⁻). The peaks around 1027 and 1038 cm⁻¹ could be attributed to GulA and ManA respectively, allowing the estimation of a M/G ratio < 1 [55]. This value was in accordance with M/G ratio of alginates extracted from *C. compressa*, *S. longicuris*, *A. nodosum*, *S. oligocystum* [14,81,43].

3.2.3. Structural features of FHS and AHS

3.2.3.1. Monosaccharide composition of FHS

As shown in Table 2, FHS was mainly composed of Fuc (45%), Gal (18%), and a small amount of GalA (12%), Xyl (12%), Ara (10%), and Rha (1%). FHS was thus probably a sulfated heterogalactofucan, which was in concordance with the literature and other sulfated fucoidans extracted from Phaeophyceae species [56]. The Fucp/Galp ratio was close to 2.4, which is consistent with fucoidans extracted, for instance, from *E. Cava* (2.41) [53]. Yet, the F/G ratio can significantly change regarding the seaweed specie or the extraction procedure, since values ranging from 1 to 14, e.g., 1.13, 1.39, 8.2 and 13.82 have been respectively reported for *S. japonica*, *C. barbata*, *F. evanescens* and *S. cichorioides* [57].

Table 2. Characterization of FHS and AHS fractions.

Fractions	Monosaccharides ^f								
	Fuc	Gal	Xyl	Ara	Rha	Glc	GulA	ManA	GlcA
FHS ^a	44.61 ± 3.17	18.44 ± 0.61	12.54 ± 0.74	9.6 ± 0.66	1.88 ± 0.34	12.92 ± 3.19	-	-	traces (nd)
AHS ^b	-	-	-	-	-	-	70.18	30.38	-

^a The analyses were run in triplicate, and the relative standard deviations were less than 5%. Nd: not determined.

^b The monosaccharide composition was determined by ^a GC/MS-EI for FHS (mol%) and ^b HPAEC-PAD for AHS (mass%). Fuc: Fucose, Gal: Galactose, Xyl: Xylose, Ara: Arabinose, Rha: Rhamnose, GulA: Gularonic acid, ManA: Mannuronic acid, GalA: Galacturonic acid.

3.2.3.2. M/G ratio and distribution of AHS

671
1
2
3 672 NMR analysis constitutes an accurate method for characterizing the structure of alginate
4
5 673 (Section 2.8.2.). The ^1H spectrum of AHS (Supplementary data, Fig. S3) revealed the presence
6
7
8 674 of signals corresponding to the anomeric proton of guluronic acid (G-1) at 5.53 ppm (signal I)
9
10 675 and guluronic acid H-5 (GG-5 G) at 4.92 ppm (signal III). On the other hand, at 5.13 ppm
11
12 676 (signal II), the overlap between the anomeric mannuronic acid proton (M-1) and C-5 consists
13
14
15 677 of alternating blocks (GM-5) was observed [58]. The M/G ratio of AHS was around 0.35 (26
16
17 678 % ManA, 74% GulA). The result was in concordance with the M/G previously estimated by
18
19
20 679 the FTIR analyses. HPAEC-PAD signals (data not shown) highlighted two different retention
21
22 680 times in the range of eluted uronic acids, i.e., $t_{\text{R1}} = 17.9$ and $t_{\text{R2}} = 18.1$ min that were assigned
23
24
25 681 to GulA and ManA, allowing the determination of a M/G ratio close to 0.43. Some previous
26
27 682 studies showed that sodium alginates extracted from *C. myrica*, *S. polycystum*, and *S. muticum*
28
29
30 683 had M/G ratio ranging from to 0.12 to 0.45 [6]. But in comparison to other species, this M/G
31
32 684 ratio was lower than those extracted from *L. digitata*, *D. antarctica*, or *L. japonica* which had
33
34
35 685 M/G ratio around 1.12, 3, and 1.86, respectively. Note that the values of F_{GG} , F_{MM} , F_{GM} (or
36
37 686 F_{GM}) blocks of AHS were respectively 0,45, 0,29 and 0.29, which agreed with the M/G ratio
38
39
40 687 previously determined. Overall, AHS should be able to form an elastic gel with a value of $\eta =$
41
42 688 ($1.5 > 1$), and AHS was rich in homopolymeric blocks (GG). This η value was like those reported
43
44 689 for the alginates extracted, as example, from *A. nodosum* [16].
45
46

3.2.3.3. Macromolecular values of FHS and AHS in dilute regime

47
48 690
49
50 691
51
52
53 692 SEC-MALS analyses were conducted to evaluate the macromolecular properties of FHS and
54
55 693 AHS fractions in dilute regime (Table 3). For FHS, the number average molecular weight (M_n)
56
57
58 694 was about $2,76 \times 10^5$ g/mol and the weight average molecular weight (M_w) was about $8,14 \times$
59
60 695 10^5 g/mol. These values were higher than those reported for fucoidans extracted from other
61
62
63
64
65

696 brown seaweeds such as *F. spiralis* or *B. bifurcate*, i.e., 20×10^3 g/mol and 14×10^3 g/mol,
 697 respectively [37]. The polydispersity index (Đ) was closed to 2.9 which revealed a certain
 698 heterogeneity in the molar masses. This is a common observation for natural fucoidans
 699 extracted and purified from seaweeds, as showed for example with two fucoidan fractions
 700 reported in the literature, one from *Fucus vesiculosus*, with $\text{Đ} = 1.89$ [59], and the other from
 701 *Laminaria japonica*, with $\text{Đ} = 3.82$. The intrinsic viscosity of FHS was close to 764 mL/g,
 702 which is relatively high regarding the literature, even if various fucoidans extracted from the
 703 brown seaweed *Cystoseira trinode*, *Sargassum latifolium*, or also *Cystoseira myrica* showed
 704 some values ranging from 860 to 870 mL/g [60].

705 **Table 3.** SEC-MALS analyses of FHS and AHS fractions.

Fractions	Recovering (%, w/w)	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)	Đ	Rg (nm)	Rh (nm)	[η] (mL/g)	C* (g/L)
FHS	23	8.14×10^5	2.76×10^5	2.9	76	43	764	1.05-5.24
AHS	40	2.52×10^5	1.14×10^5	2.2	nd	21	318	2.52-12.6

706 *The analyses were run in duplicate, and the relative standard deviations were less than 5%.*

707 *Mw: Weight average molecular weight; Mn: Number average molecular weight; Đ: Polydispersity index Mw/Mn; Rg: Gyration radius; Rh:*
 708 *Hydration radius; [η]: Intrinsic viscosity; C*: Theoretical critical concentration defined by 0.8 to $4 / [\eta]$. nd: not determined.*

709
 710 ASH showed two Mn and Mw values of 1.14×10^5 g/mol and 2.52×10^5 g/mol, respectively.
 711 Regarding the literature, the alginates extracted from *C. sedoides* and *F. vesiculosus* had slightly
 712 lower Mw values (1.4×10^5 and 1.17×10^5 g/mol) [61]. Yet, our results are still in agreement
 713 with numerous other alginate fractions, e.g., from *Sargassum turbinarioi*, with a Mw about 5.53
 714 $\times 10^5$ g/mol. The polydispersity index of AHS ($\text{Đ} = 2.2$) is relatively low regarding the
 715 extraction and purifications processes used. Its intrinsic viscosity (318 mL/g) agreed with other
 716 publications, like for alginates extracted from *Hormophysa sp.* (392 mL/g), *C. trinode* (283
 717 mL/g) or *C. myrica* (860 mL/g) [60,24]. In addition, the high value of C* was estimated between
 718 3.52 and 12.6 g/L, reflecting a weak rheological behavior (without addition of CaCl₂). Note that
 719 regarding the recovery ratios, just a part of the samples (23 and 40%) has been analyzed.

3.3. Rheological behavior of AHS

3.3.1. Flow behavior of AHS solutions at 25 °C

The intrinsic viscosity of AHS was close to 318 mL/g which was like alginates extracted from *Cystoseira* species, e.g., ranging from 283 to 860 mL/g for *C. trinode*, *C. myrica* and *C. barbata* [6]. The viscous characteristics of AHS solutions at 25°C and at different concentrations (0.0125 to 2.5% (w/v)) were investigated using the steady-shear flow test, and the AHS flow curves were represented over apparent viscosity (η) vs. the shear rate which was ranging from 0.001 to 1000 s⁻¹ (Fig. S5). In fact, depending on the AHS concentration, two flow behaviors were described due to the relations between the viscosity and the shear rate. At concentrations ranging from 0.0125% to 0.35%, AHS exhibited a Newtonian behavior, especially at higher shear rate values. At concentrations above 0.5 % (w/v), the flow curves described a shear-thinning behavior with the absence of Newtonian plateau region at the full range of shear rates. These findings imply that polymer chains in the aqueous medium adopted a more intertwined network for these concentrations. Overall, AHS at concentrations ranging from 0.5 to 2.5% w/v exhibited a pseudoplastic behavior (Fig. S5). The steady-shear flow (qualified as shear-thinning) was in concordance with the previous results obtained for aqueous solutions of other sodium alginates [62].

The power law model was used to describe the shear parameters for various AHS solutions ranging from 0.5% to 2.5% (w/v) (Table 5). AHS solutions above 0.5% confirmed the shear-thinning fluid property with a flow behavior index value (n) under than one. In addition, the increase in polymer concentration increased the coefficient of consistency (k) while decreasing the n values. The AHS solutions with concentrations greater than 0.5% had linear correlations to the power law model ($R^2 > 0.99$), indicating that the power law model can appropriately describe the rheological behavior of AHS solutions and proved their pseudoplastic properties.

747 **Table 5.** Ostwald de Waele model fitting parameters of AHS.

	Concentrations (%, w/v)	0.5	0.75	1	1.5	2	2.25
25°C	n	0.726 ± 0.007	0.707 ± 0.003	0.603 ± 0.01	0.318 ± 0.013	0.325 ± 0.011	0.163 ± 0.028
	K	0.0765 ± 0.002	0.079 ± 0.001	0.301 ± 0.01	2.73 ± 0.134	7.45 ± 0.322	20.23 ± 2.88

748

749

750

3.3.2. Effect of temperature on the viscosity of AHS solutions

751

752 The viscosity of AHS solutions from 0.5% to 2.5% m/v, decreased with increasing temperature

753 25, 40 and 60°C across a broad range of shear rates (from 1 to 1000 s⁻¹) and a pseudoplastic

754 behavior was shown (Fig. S6). The weakness of the n values can be attributed to the well-known

755 phenomenon of thermal expansion [54]. The increase of temperature from 25°C to 60°C also

756 increased the n values but diminish the k magnitudes. These results explain that heat treatment

757 maintains the pseudoplastic behavior with n values < 1. As reported by Hentati et al. [46], the

758 flow of viscous solution is described as the crossing of an energy barrier by a molecular unit of

759 this solution. So, this transition is accelerated by increasing the temperature of the solution.

760 Moreover, this temperature-dependent behavior of AHS may be explained by the transition of

761 the solution from one energy balance to another, the degradation of polysaccharides or the

762 conformational change of AHS in solution. Benaoun et al. [54], reported that linear

763 polysaccharides are strongly bound by inter- or intra-chain bonds and therefore have a high

764 energy activation compared to branched polymers. In general, a higher value of energy

765 activation means a faster change in the viscosity of AHS solutions with temperature.

766 Aqueous solutions of AHS at concentrations ranging from 0.5 to 2.5 % (w/v) showed that η

767 decreased with the action of shearing time. Alginate chains did not probably find instantly its

768 properties after being requested and should require a certain time to recover its initial viscosity

769 (characteristics of viscoelastic fluids) [63]. These results are consistent with the literature where
1
2 770 their behavior was confirmed for sodium alginate solutions at different concentrations [62,63].
3
4 771 These studies revealed that the decrease in viscosity with shear time was mainly due to the non-
5
6
7 772 Newtonian pseudoplastic behavior, entanglement processes as well as the disturbances in
8
9
10 773 alignment of polymers chains.

11 774 **3.3.3. AHS and Dynamic viscoelastic properties**

12
13
14 775 The dynamic mode analyses were carried out on AHS solutions at 0.5 % (w/v) and at 25 °C
15
16
17 776 (Fig. S7). In addition, the elastic and the viscous modulus corresponding to G' and G'' ,
18
19 777 respectively increased with the rising of angular frequencies. The aqueous AHS solution
20
21
22 778 revealed a viscous behavior because of the G'' values were higher than the G' values from 0.1
23
24 779 to 100 rad/s⁻¹. This result was close to commercial sodium alginate reported by Ma et al. [62].
25
26
27 780 Moreover, G' and G'' tended to approach to each other at high frequency and thus revealing
28
29 781 that the $\tan \delta$ values decreased with the rise of angular frequencies that indicate the great
30
31 782 viscoelastic behavior of AHS.

32 33 34 783 **3.3.4. Effect of CaCl₂ on the viscosity of AHS solutions**

35
36 784 Two % (w/v) of AHS solutions were supplemented with CaCl₂ (10 and 20 mM) then analyzed
37
38
39 785 at 25°C to determine their characteristics as strengthened gels. In addition, the shear rate effect
40
41 786 (from 0.001 to 1000 s⁻¹) was evaluated, and the shear data was analyzed based on the power-
42
43
44 787 law model (Ostwald de Waele). Thus, the addition of CaCl₂ increased the AHS viscosity for all
45
46 788 shear rates (0.001-10 s⁻¹), the AHS solutions presenting a non-Newtonian shear-thinning
47
48
49 789 behavior. According to the power law model, after adding the CaCl₂, at 10 mM and 20 mM,
50
51 790 the k values greatly increased from 5.85 ± 0.88 to 11.92 ± 1.92 and the n values decreased from
52
53 791 0.14 ± 0.04 to 0.02 ± 0.04. These results could be explained by the formation of networks cross-
54
55
56 792 linked by transverse bonds between guluronic residues (GG blocks) in the presence of Ca²⁺

793 ions. This network obviously led to an enhancement of the pseudoplastic character of AHS
1
2 794 gels (Fig. S8).
3

4 795 **3.3.5. Determination of the critical concentration determinations of** 6 7 796 **AHS**

9 797 Plotting the specific viscosity (η_{sp}) in function of AHS concentration was interesting for
10
11 798 determining the limit that connects dilute (non-branched system), semi-dilute regimes
13
14 799 (branched system) and highly branched regimes in water, at 25°C. Note that the results were
15
16 800 expressed after using the cross-model. The experimental critical overlap (C^*) and critical
18
19 801 aggregating (C^{**}) concentrations of AHS solutions were indicated by the slope breaks (Fig. S9
20
21 802 (Supplementary data)). C^* were respectively around 1.09 g/L (0.109%, w/v) and 6.4 g/L
23
24 803 (0.640%, w/v). This result was lower than the theoretical C^* values calculated by using the
25
26 804 intrinsic viscosity, previously determined by SEC/MALS (0.252-1.26%, w/v) (see Table 3).
27
28
29 805

31 806 **3.4. Biological activities**

33 807 **3.4.1. Antioxidant activities of FHS and AHS**

34 808 The antioxidant activities of FHS and AHS were assessed after the measurement of the
35
36 809 inhibition percentage of DPPH oxidation (Fig. 2A). FHS exhibited an antiradical activity with
37
38 810 an IC_{50} values of about 1 100 $\mu\text{g/mL}$ which was significantly lower than the control ($p < 0.02$)
39
40 811 under a concentration of 1.5 mg/mL. At 2 mg/mL, FHS revealed an antioxidant capacity against
41
42 812 DPPH close to 76.66% which was slightly lower than the control ($p < 0.02$). It was lower than
43
44 813 other values previously reported, for fucoidans extracted from *C. compressa* (90%) [14] Yet,
45
46 814 this activity was significantly higher than those published, as instance for galactofucans
47
48 815 extracted from *S. vulgare* and *S. pallidum* (22.5% and 19.1%, respectively) [47] At 2 mg/mL,
49
50 816 AHS showed a maximum antiradical activity close to 35.8% without reaching a calculable IC_{50}
51
52 817 value, this value was significantly lower than the control ($p < 0.0002$) on the contrary to the
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

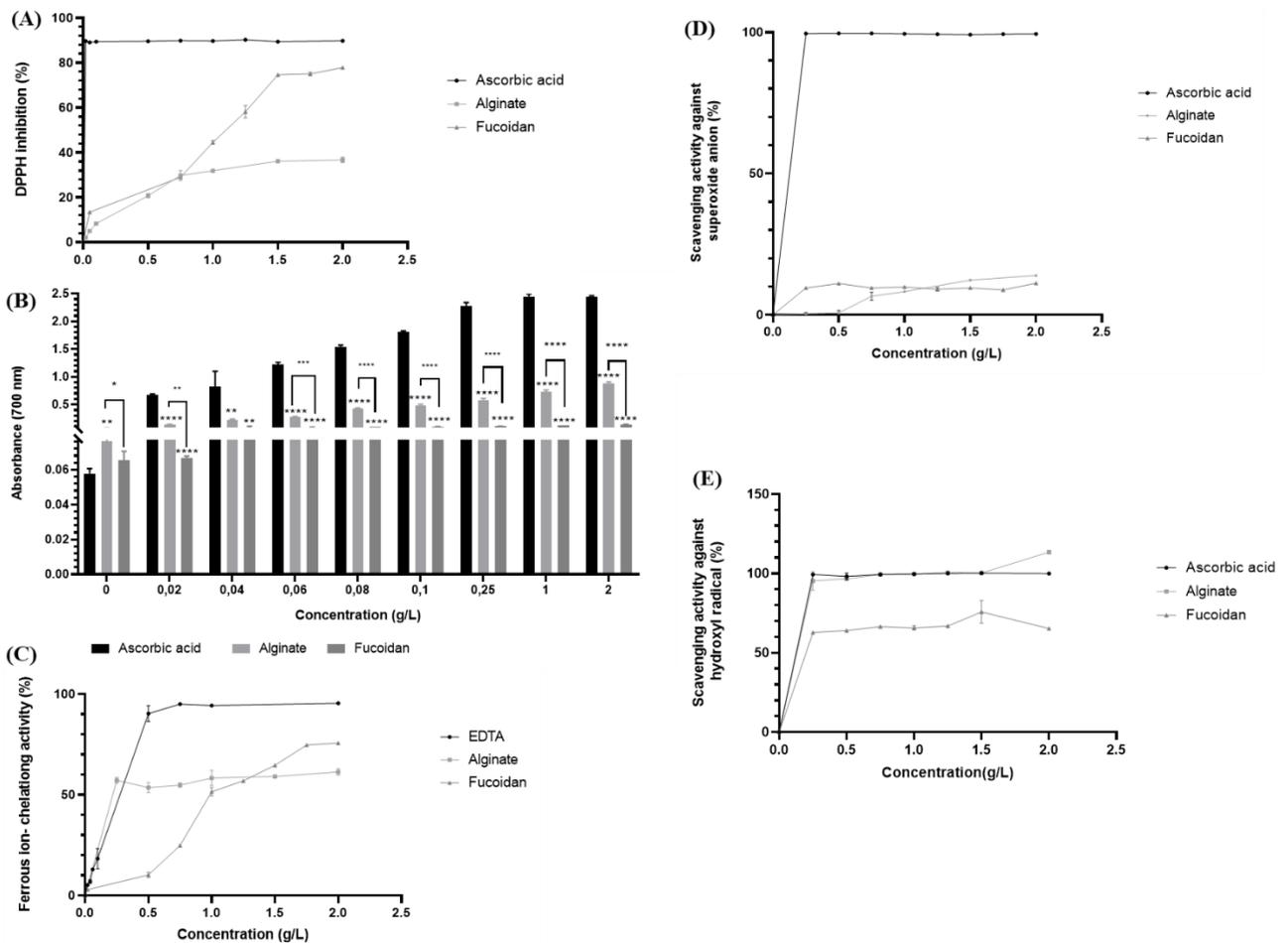
818 activities reported for alginates from *C. compressa* (70%) [14] or *C. sedoides* (90%) [48]

819 Generally, the ability of antioxidant polysaccharides to scavenge DPPH radicals is clearly

820 related to their hydrogen-donating capacity but also the presence and location of sulfate groups,

821 as reported by Mohanta et al. [64].

822



823

824 **Fig. 2.** Evaluation of the antioxidant properties of FHS and AHS fractions regarding the

825 scavenging activity of DPPH-radical (A), ferrous ion-chelating power (B), ferric-reducing

826 activity (C), scavenging activity against superoxide anion (D) and scavenging activity against

827 hydroxyl radical (\bullet OH) (E). The same dots legend is used for A, B, D and E graph.

828

829 Polysaccharides can reduce the complex $Fe^{3+}/ferricyanide$ and the obtained ferrous form (Fe

830 (II)) can be monitored after the formation of a Perl's blue complex (Prussian blue) [65] (Fig.

831 2B). The reducing powers of both FHS and AHS were dose-dependent, with maximum values
1
2 832 around 135 $\mu\text{g/mL}$ and 890 $\mu\text{g/mL}$ respectively at 2 mg/mL. The values for FHS were in
3
4 833 accordance with the literature, with data ranging from 120 to 450 $\mu\text{g/mL}$ at 2 mg/mL for
5
6
7 834 fucoidans extracted from *L. japonica* or *S. glaucescens*, respectively [66]. The AHS reducing
8
9 835 activity was significantly lower ($p < 0.0001$) than for ascorbic acid at the same concentrations,
10
11 836 as well as in other reports, for instance for the alginates extracted from *C. compressa* (1 900
12
13 837 $\mu\text{g/mL}$ at 1 mg/mL) [14] Note that the reducing capacities of FHS and AHS could be influenced
14
15
16 838 by the sulfation rate and distribution, the molecular weight and the presence of free hydroxyl
17
18
19 839 groups but also carboxylic groups of uronic acids [14].
20
21

22 840 The capacities of both fractions to complex Fe^{2+} were assessed by measuring the interference
23
24 841 of the complex Ferrozine- Fe^{2+} (Fig. 2C). The chelating powers of ferrous ions exhibited by FHS
25
26 842 and AHS raised in a dose-dependent manner but had lower values (about 76 % and 62.47% at
27
28
29 843 a concentration of 2 mg/mL) with ($p < 0.9$) in comparison with EDTA (99.31 %). The chelating
30
31 844 activity of FHS was higher than those described for *D. mertensis* (45%) and *C. Caudata* (42%)
32
33 845 at the same concentrations [3], with an IC_{50} of about 1 000 $\mu\text{g/mL}$, which was better than the
34
35
36 846 chelating activity of *Cystoseira sedoides* (IC_{50} around 10 000 $\mu\text{g/mL}$) [48] but still less efficient
37
38
39 847 than for *C. barbata* (IC_{50} around 300 $\mu\text{g/mL}$) [47]. These authors highlighted the absence of
40
41
42 848 iron chelation activity of some fucans extracted from *C. isthmocladum* (7%), *S. filipendula*
43
44 849 (11%) and *S. schroederi* (9%). In addition, Gülcin et al. [67] reported that the difference in
45
46
47 850 chelating activity was related to the presence/absence of functional groups, such as sulfates, as
48
49 851 well as their positions all along the backbone. Other studies revealed the importance of glycosyl
50
51
52 852 linkages like 1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 4, and 1 \rightarrow 6 as well as the types of monosaccharides, such as Fuc, Man
53
54 853 and Rha in chelating activity [68]. Besides, the molecular weight of polysaccharides and their
55
56
57 854 purity are involved in their antioxidant activities. The IC_{50} of AHS was about 0.2 mg/mL which
58
59
60
61
62
63
64
65

1 855 was higher than the value reported for *C. compressa* (0.3 mg/mL) [14]. The chelating activity
2 856 of alginates depends on their functional groups, and mainly the ManA residues.
3

4
5 857 Superoxide anion radicals can be generated in the normal catalytic function of many enzymes
6
7 858 in biological systems, causing oxidative stress. As a result, the ability of polysaccharides to
8
9 859 inhibit superoxide productivity was investigated (Fig. 2D). The scavenging activities against
10
11 860 superoxide anion of FHS and AHS were highly lower than ascorbic acid ($p < 0.0001$ and $p <$
12
13 861 0.0015 , respectively) and were about 13.94% and 11.22%, respectively at a concentration of 2
14
15 862 mg/mL. These results were like those reported for fucoidans extracted from *Sargassum*
16
17 863 *polycystum*, *Turbinaria ornate* or *Padina boryana* (8.9 to 15.4%) but lower than the activity
18
19 864 published for *Sargassum binderi* (61.0%) [69]. The scavenging activity of AHS agreed with the
20
21 865 values reported for alginates extracted from the same previously cited macroalgae (16.3 to
22
23 866 19.8%) [69]. Overall, the scavenging activities for both fractions were significantly lower than
24
25 867 for EDTA (100%) at the same concentration, which clearly indicated the limited valuable
26
27 868 potential for managing oxidative stress by using these polymers. Note that the scavenging
28
29 869 activities, especially for alginates, were correlated to their acidic nature and especially the
30
31 870 richness in GulA residues.
32

33
34 871 The most reactive oxygen radical is the hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$). Removing $\bullet\text{OH}$ is critical to
35
36 872 prevent damage to body-related compounds like proteins, DNA, and nucleic acids. The $\bullet\text{OH}$
37
38 873 scavenging activities of FHS and AHS were close to 64% and 10%, respectively (Fig. 2E). The
39
40 874 $\bullet\text{OH}$ scavenging activity of FHS was like those reported for fucoidans isolated from *Sargassum*
41
42 875 *polycystum*, *Turbinaria ornate* or *Padina boryana* species showing some $\bullet\text{OH}$ scavenging
43
44 876 activities ranging from 53.4 to 56.5% at 2 mg/mL but lower than the activity reported for a
45
46 877 fucoidan extracted from *S. fusiform* (20.8%) [69]. These results indicate the potential of
47
48 878 fucoidans from *H. scoparia* as a natural compound $\bullet\text{OH}$ radical scavenger, even if their activity
49
50 879 was significantly lower than ascorbic acid with ($p < 0.0006$), with an IC_{50} around 0.25 mg/mL
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2 880 and (100%) of scavenging activity at 2 mg/mL. Besides, AHS showed significant •OH
3 881 scavenging activities close to those found for ascorbic acid (100%) at 2 mg/mL. It was higher
4 882 than for alginates extracted from *Sargassum polycystum*, *Turbinaria ornate*, *Padina boryana*
5
6 883 (around 80% at 2 mg/mL) [69]. or from *Cystoseira barbata* (around 50% also at 2 mg/mL) [47].
7
8 884 It is noteworthy that AHS, which possessed a lower molar mass than FHS and ManA/GulA
9
10 885 residues, showed the best •OH scavenging and antioxidant ability on oxygen free radicals,
11
12 886 which was in accordance with the literature for alginates and sulfated polysaccharide, both
13
14 887 extracted from the same seaweed *Laminaria japonica* [70].
15
16
17
18

19 888 **3.4.2. Anti-inflammatory and anti-coagulant activities**

20
21 889 The inhibition of BSA denaturation induced by heating at 70°C was employed to
22
23 890 examine the anti-inflammatory activity of FHS and AHS (Fig. 3). The IC₅₀ values were about
24
25 891 1 mg/mL, for both AHS and FHS, which was significantly better than the positive control
26
27 892 (diclofenac, IC₅₀ around 3mg/mL) with (p < 0.03 and 0.01, respectively). Regarding the
28
29 893 literature, numerous fucoidans exhibited various capacities to inhibit the BSA denaturation,
30
31 894 e.g., with some IC₅₀ of 1 mg/mL, 3 mg/mL, 200 µg/mL, and 60 µg/mL for *H. scoparia*, *F.*
32
33 895 *serratus*, *F. vesiculosus* or *Sargassum wightii* respectively [71].
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

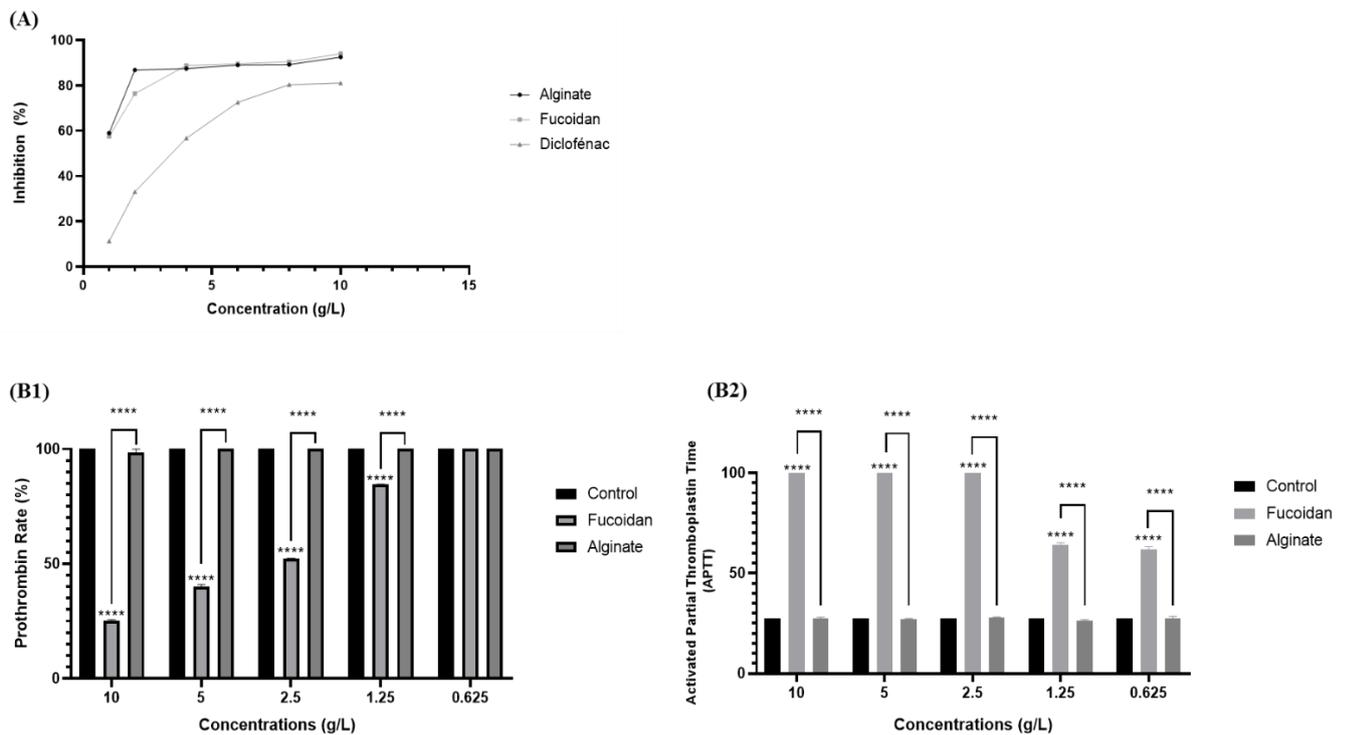
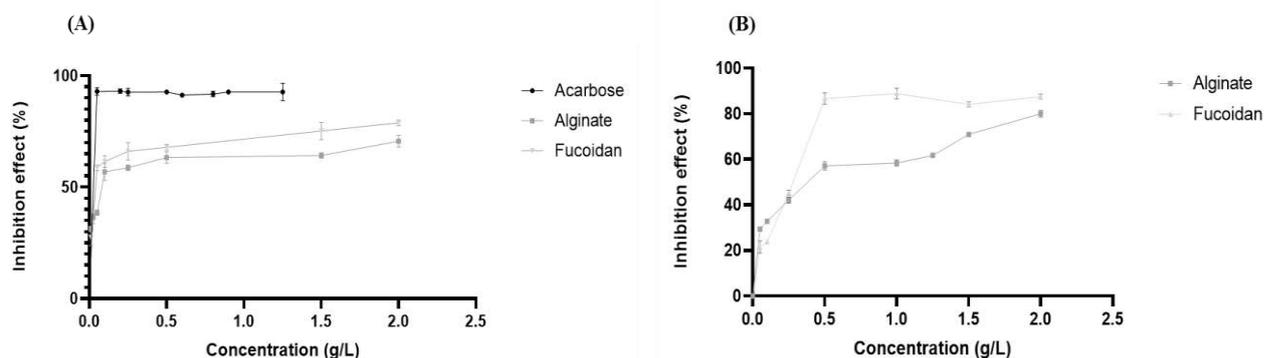


Fig. 31. Effects of FHS and AHS fractions on thermally denatured BSA (A), prothrombin rate (B1) and activated partial thromboplastin time (B2).

The best results were obtained with high contents in sulfates (27.5%) and the significant presence of Fucp residues all along the backbone [71]. For alginates, the positive charge of functional group in BSA may bind with the alginate carboxyl groups and create BSA/alginate complexes, thus enhancing the proteins thermostability. On the other hand, to assess the potential *in vitro* anticoagulant effects of FHS and AHS, the prothrombin time (PT) and activate partial thromboplastin time (APTT) tests were performed for both fractions using heparin as control. The obtained results are summarized in Fig. 3B. The two fractions could increase APTT and PT in a concentration-dependent manner. The values for AHS were in the same order than for heparin (27sec and 100%, respectively, at concentrations ranging from 0.625 to 10 mg/mL); whereas those found for FHS were significantly higher than for heparin. Thus, FHS enhanced the clotting time of APTT and the rate of prothrombin, especially at low concentrations (625 µg/mL). These results suggested the inhibition of the intrinsic factors and/or the common

912 pathways by using FHS. In comparison to other studies, a fucoidan extracted from *Undaria*
 913 *pinnatifid* showed a weaker prolonged APTT and a weaker rate of prothrombin than heparin
 914 [72]. A sulfated galactan extracted from *Codium cylindricum* exhibited some notable
 915 anticoagulant activities with values of APTT and PT higher than 300 s and 19.7 s respectively,
 916 at a concentration (15 $\mu\text{g/mL}$) [73]. Karaki et al. [33] showed that the mixture of fucoidan and
 917 mannuronan exhibited an APTT of 40.8 s while the mixture of fucoidan, laminarin, and
 918 mannuronan complex allowed to get an APTT of 43.4 s. Jin et al. [74] suggested that APTT
 919 (intrinsic pathway) could depend on the Fuc/Gal ratio as well as the average molecular weight.
 920 PT (extrinsic pathway) could be influenced by the dose and content in sulfate groups but also
 921 the structural features of fucoidans, without involving their molecular weight. The negative
 922 charge of sulfate groups is used to neutralize, in a dose dependent way, the positive charge of
 923 amino acid residues in anti-thrombin, which improves anticoagulant activity, thus inhibiting the
 924 factors IIa and Xa activity. Several other studies showed that sulfate groups could not increase
 925 PT but could affect the coagulation factors in the extrinsic pathway [75].

3.4.3. Anti-diabetic effect



928 **Fig. 4.** Effects of FHS and AHS fractions on α -amylase inhibition (A1, A2) and trypsin
 929 inhibition (B1, B2).
 930

931 The ability of FHS and AHS to inhibit α -amylase was conducted, using acarbose as a control
1
2 932 (Fig. 4A). FHS showed the highest inhibition of 78.89%, whereas AHS showed an inhibition
3
4
5 933 rate close to 70.64%, both at 2 mg/mL, which was lower than for acarbose (95%, IC₅₀ around
6
7 934 20 μ g/mL) with ($p < 0.1$ and 0.03 for FHS and AHS, respectively). The IC₅₀ value (40 μ g/mL)
8
9 935 of FHS was significantly higher than for other fucoidans, for instance, from *A. nodosum* (4.64
10
11 936 mg/mL) or *F. vesiculosus* (49 μ g/mL). The IC₅₀ value (0.1 mg/mL) of AHS was in agreement
12
13
14 937 with the literature, as reported for *Undaria pinnatifida* (0.103 mg/mL) or commercial alginates
15
16
17 938 (0.096 mg/mL) [76]. Houghton et al. [77] reported that alginates can form gels which can
18
19 939 directly interact with digestive and gastrointestinal enzymes, such as pancreatic lipases and
20
21
22 940 pepsin, thus reducing the absorption of triacylglycerols, cholesterol, and glucose in the intestine.
23
24 941 Alginates can generate viscous solutions, which may act as a barrier to starch digestion and
25
26
27 942 have an impact on glucose uptake. Besides, alginates, like other dietary fibers, can prolong
28
29 943 stomach emptying, enhance digestive fluid viscosity, and lower cholesterol. Regarding
30
31
32 944 fucoidans, the inhibition of α -amylase may be due to the formation of hydrogen bonds between
33
34 945 the hydroxyl group in fucoidan structures and α -amylases [78]. Furthermore, the oxygen ions
35
36 946 of the sulfated groups in C-2 and/or C-3 positions are useful for generating hydrogen bonds or
37
38
39 947 salt bridges with amino acids to increase the contact with α -amylases. Thus, the inhibition
40
41 948 hypoglycemic activity can be influenced by the degree of sulfation and their distribution along
42
43
44 949 the backbones [79].

45
46
47 950 Both FHS and AHS fractions were able to inhibit trypsin activity, reaching respectively 80.05%
48
49 951 and 87.52% at 2 mg/mL (Fig. 4B). The difference in trypsin inhibition by AHS and FHS was
50
51
52 952 not significant with a ($p < 0.08$) but the inhibition of trypsin (IC₅₀ around 0.4 mg/mL) by AHS
53
54 953 was more significant than for other commercial alginates (such as from FMC Biopolymer and
55
56
57 954 Technostics Ltd, Hull, UK) (IC₅₀ 0.3 mg/mL) described in the literature [80]. ManA-enriched
58
59 955 alginates showed the best results, as reported by Strugala et al. [81]. this specific structural
60
61
62
63
64
65

956 feature enhancing the flexibility of the main backbone [80]. The efficiency of alginates for
 957 inhibiting trypsin is also due to their gel behavior, which is suited to oral insulin delivery. It
 958 allows insulin to remain in the digestive system for a longer time, and thus increases the
 959 absorption process [80]. Besides, electrostatic interactions between the sulfate groups of
 960 fucoidans and positively charged regions of caseins have been involved in the inhibition of
 961 trypsin [82]. Many studies also demonstrated that heparin sulfates or carrageenans can inhibit
 962 pancreatic enzymes due to their capacity to interact with casein-like proteins [83]. In fact, the
 963 interaction between fucoidan and charged proteins disturbed the interaction of trypsin and
 964 ingested proteins, thus allowing the regulation of hyperglycemia.

3.4.4. Antiviral activity

966 The effects of FHS and a hydrolyzed version (FHSh) were investigated against human
 967 pathogens HSV-1. No cytotoxic effect was observed on the Vero cells in the range of the
 968 concentrations assayed for all compounds (Table 4).

Table 4. Cytotoxicity and antiviral effects (IC₅₀) of FHS and FHSh fractions.

	Cytotoxicity (µg/mL)	Antiviral activity (Anti-HSV1) (µg/mL)
Zovirax (Control)	>200	0.39 ± 0.11
FHS	>200	27.84 ± 1.61
FHSh¹	>200	19.44 ± 0.36

¹Hydrolyzed fraction of FHS

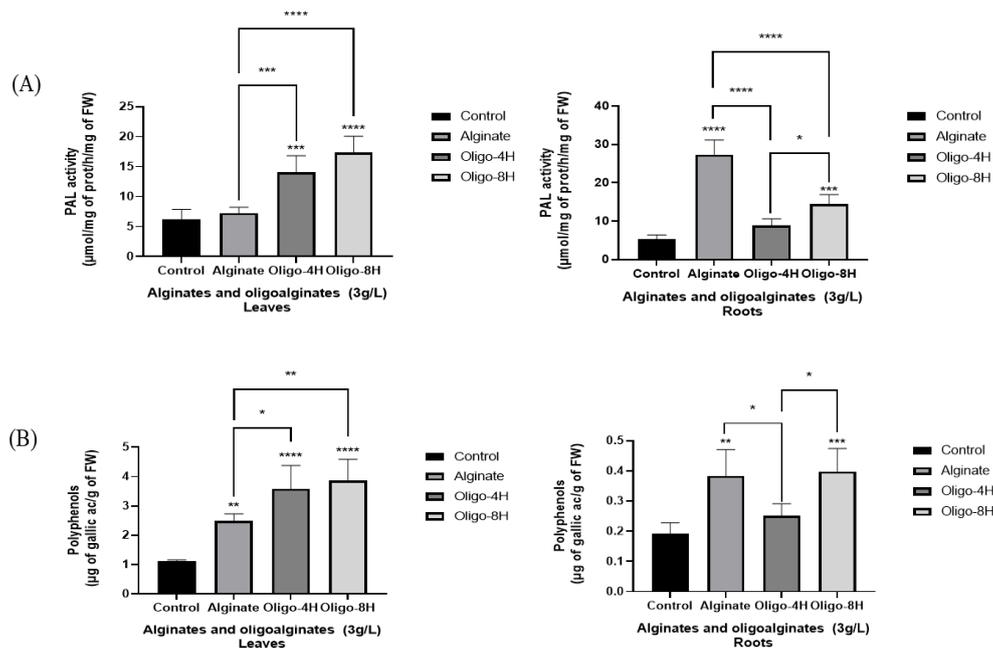
971 Both fractions showed some significant EC₅₀ values, in order to 19.44 ± 0.36 and 27.84 ±
 972 1.61 µg/ml respectively for a MOI (medium at a multiplicity of infection) of 0.001 ID₅₀/cells.
 973 These values were in accordance with the literature demonstrating the ability of native and
 974 modified fucoidans to inhibit the replication of herpes simplex virus HSV-1 [84]. For instance,
 975 we can cite a sulfated galactofucan extracted from *Undaria pinnatifida* (EC₅₀ around 32 µg/mL)

976 or some extracts from *C. fragile* and *C. crispus* (EC₅₀ values ranging from 77.6 to 129.8 µg/mL)
1
2 977 at a MOI of 0.001 ID₅₀/cells without any cytotoxicity [84]. Bourgougnon et al. [85] observed
3
4 978 that some extracts rich in sulfated water-soluble polysaccharides of the red alga *Schizymenia*
5
6
7 979 *dubyi* inhibited the HSV-1 proliferation (EC₅₀ = 2.5-80 µg/mL). Previous studies showed that
8
9 980 many sulfated polysaccharides can limit herpetic infection by preventing adsorption,
10
11 981 penetration, adhesion, and viral transmission from cell to cell. Sulfated galactofucans have a
12
13 982 strong inhibitory effect on HSV-1, as shown by Sun et al. [86]. who highlighted that a highly
14
15 983 sulfated fucoidan (31.92%) extracted from *Sargassum henslowianum* had an IC₅₀ value against
16
17 984 HSV-1 around 0.89 µL/mL. The authors also showed that the position of the sulfate groups,
18
19 985 especially in C-2 and C-4, were of first importance for the antiviral activity. Note that the
20
21 986 molecular weight of seaweed polysaccharides also determines their antiviral potential [87].
22
23
24
25
26

987 **3.4.5. Elicitor activity**

988 The stimulation of the phenylpropanoid defense pathway in tomato seedling leaves in response
989 to alginates and oligoalginates treatments were assessed by measuring of PAL activity and
990 phenolic compound production. PAL is a major enzyme that has an essential role in the phenol
991 production pathway, which is thought to be the primary inducible response in vegetables
992 essentially plants against biotic and abiotic stresses. PAL is thus the principal enzyme that can
993 convert phenylalanine and produces phenolic compounds by three different pathways such as
994 shikimate, malonate, and mevalonate. The effects of PAL activity and polyphenols on plant
995 resistance following seaweed polysaccharide treatment have been extensively studied. Beside
996 alginates, other polysaccharides derived from green and red macroalgae and their oligomers,
997 such as ulvan, a sulphated polysaccharide from green seaweeds have been intensively
998 researched for their ability to boost a wide spectrum of defensive mechanisms in diverse plants.
999 The radical depolymerization of AHS using H₂O₂ allowing to get two hydrolyzed versions
1000 (oligo-alginates) [37] As detailed in Section (3.2.3.3.), AHS had a Mw value close to 5.52 ×

1001 10^5 g/mol ($M/G < 1$) whereas the two oligo-alginates (produced after 4 and 8 h of
 1002 depolymerization, respectively named “oligo-4h” and “oligo-8h”) had a Mw value around 21
 1003 800 g/mol and 18 700 respectively (\bar{D} around 2.7). In fact, the oligo-alginates allowed to reach
 1004 high polyphenol concentration and Pal activity in Tomato leaves, whereas the use AHS leaded
 1005 to the high Pal activity and polyphenol content in Tomato roots (Fig. 5).



1006 **Fig. 5.** Effects of Alginate (AHS, 552 kDa) and oligo-alginates derivatives (oligo-4h: 21,8 kDa
 1007 and oligo-8h: 18,7 kDa) activity in Tomatoes leaves and roots: **(A)** PAL activity **(B)** Phenolic
 1008 compounds accumulation.
 1009

1010 Previous studies showed that alginates and oligo-alginate rich in poly-ManA induced a
 1011 sustained increase in PAL activity in wheat and tobacco leaves, on the contrary to alginates and
 1012 oligo-alginates rich in poly-GulA. Indeed, alginates with high concentration of poly-ManA can
 1013 activate plant defense responses, possibly through the salicylic acid (SA) signaling pathway.
 1014 The oligo-alginates ($DP \leq 24$) obtained from *Bifurcaria bifurcata* using H_2O_2 , showed the
 1015 ability to strongly stimulate the natural defenses of tomato seedlings [37,71]. Thus, the oligo-
 1016

1017 4h and oligo-8h fractions significantly enhanced the levels of the PAL activity and the
1
21018 accumulation of phenolic compounds (3.57 ± 0.25 and 3.86 ± 0.39 μg of gallic acid/g of FW) ,
3
4
51019 in comparison with the control or AHS ($p < 0.0001$). This trend was already reported in the
6
71020 literature for other alginates from seaweeds used during an infection against some
8
9
101021 phytopathogens [38]. It is noteworthy that AHS does not increase the PAL activity in the leaves
11
121022 ($7 \mu\text{mol}/\text{mg}$ of prot/h/mg of FW). The difference between AHS and oligo-alginates activities
13
141023 might be due to the target of the enzymatic activities triggered by each elicitor in the shikimate
15
16
171024 pathway. Besides, AHS seemed more effective when it was used on roots ($p < 0.0001$), reaching
18
191025 a PAL activity around 27.35 ± 3.3 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ of prot/h/mg of FW), in comparison to the oligo-
20
21
221026 alginate fractions (8.78 ± 1.6 and $14.43 \pm 2.2 \mu\text{mol}/\text{mg}$ of prot/h/mg of FW) or the control.
23
241027 The accumulation of phenolic compounds in the roots was also slightly higher using AHS and
25
26
271028 oligo-8h, especially regarding the value obtained for oligo-4h.

28
29
301029 Overall, the differences in elicitor response can be due to the chain length, molar mass, and
31
321030 structure of polymers, which results in numerous changes in cell surface contacts with various
33
34
351031 important receptors involved in regulation and signal transduction. Many studies reported that
36
371032 oligomers with degrees of polymerization (DP) between 2 and 24 can stimulate plant defense
38
391033 mechanisms. ManA enriched oligo-alginates can increased the PAL activity in wheat and
40
41
421034 tobacco leaves [38], suggesting that Poly-M can activate defense responses in plants, especially
43
441035 by the salicylic acid signaling pathway [37], Note that the procedures used to produce the
45
46
471036 oligosaccharides, such as chemical or enzymatic hydrolysis, may alter the elicitor behavior of
48
491037 these molecules [38], Overall, the interaction between proteins and their receptors appears to
50
51
521038 play an essential part in the signaling process activated by saccharide elicitors [38], It is thus of
53
541039 first importance to understand the interplay between the elicitor and the host.

571040 **4. Conclusion**

58
59
601041 The present study focuses on the extraction, the characterization of the structural features and
61
62
63
64
65

1042 the evaluation of anticoagulant, anti-inflammatory, antidiabetic, antioxidant, antiviral, and
1
21043 eliciting properties of two water-soluble polysaccharides from *H. scoparia*, a Tunisian seaweed
3
4
51044 well distributed on the north coasts. A fucoidan (FHS) and an alginate (AHS) fractions were
6
71045 characterized using colorimetric assays as well as spectroscopic and chromatographic methods
8
9
101046 such as HPAEC-PAD, GC/MS-EI, FTIR, or NMR. FHS was a sulfated (7.26%)
11
121047 heterogalactofucan (F/G ratio around 2.4), and AHS was an alginate (M/G ratio around 0.35).
13
141048 FHS and AHS present valuable antioxidant activities observed through various antioxidant
15
16
171049 tests such as ferrous ion chelation, ferric ion reduction, hydroxyl radical scavenging, DPPH
18
191050 radical scavenging, and superoxide anion scavenging which highlighted their potential as
20
21
221051 natural additives. FHS revealed antioxidant capacity against DPPH, ferrous ion chelating
23
241052 power, anion superoxide scavenging activity and hydroxyl radical scavenging activity of
25
26
271053 76.66%, 76%, 13.94% and 64% higher than AHS (5.8%, 62.47%, 11.22 and 10% respectively)
28
291054 while AHS has a higher Fe³⁺/ferricyanide complex reduction power (0.89) than FHS (0.135)
30
31
321055 At a concentration of 2 mg/mL. FHS and AHS showed a high anti-inflammatory activity by
33
341056 inhibition of BSA denaturation with an IC₅₀ of about 1 mg/mL and an effective anticoagulant
35
361057 effect by measuring the prothrombin activity and the activated partial thromboplastin time of
37
38
391058 about (100% and 61.7 s, respectively for FHS but 100% and 27 s for AHS at 0.625 mg/mL.
40
411059 Both FHS and AHS inhibited α -amylase with (IC₅₀ 40 μ g/mL and 0.1 mg/mL, respectively)
42
43
441060 and trypsin enzymes (IC₅₀ 0.3 and 0.4 mg/mL, respectively) and could be considered as
45
461061 antihyperglycemic agents. FHS and its derivative (FHSh, oligo-fucoidan) inhibited virus-
47
48
491062 induced cytopathic effects and were more effective against herpes viruses (HSV-1) with an
50
511063 EC₅₀ of about 19.44 and 27.84 μ g/ml. Finally, AHS and its derivatives (oligo-4h and oligo-8h,
52
53
541064 oligo-alginates) could be used, differently, for enhancing the natural defenses (including the
55
561065 phenylpropanoid metabolism) of tomato roots and leaves, since they could increase PAL
57
581066 activity and/or polyphenol accumulation. Further experiments are still needed to better
59
60
61
62
63
64
65

1067 characterize the fractions (e.g., FHS), especially for addressing the location of the sulfate
1
21068 groups and understand the structure-function relationship of this new fucoidan regarding the
3
4
51069 numerous screened activities. Overall, this work showed the physico-chemical and biological
6
71070 potential of well-known polysaccharides extracted from a new bioresource, which could lead
8
9
101071 Tunisia to develop seaweed exploitation sectors, both for low input fields (food) but also high
11
121072 input niche markets (health, elicitation, cosmetic).
13

151073 **5. Acknowledgment**

171074 This work has been supported by the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific
18
19
201075 Research also thanks to Hubert Curien Project (PHC) « Maghreb » EXPLORE 19-21 (19
21
221076 MAG36) and Campus France (41423UC). The authors thank Christophe Rihouey (Normandie
23
24
251077 University, UNIROUEN, INSA Rouen), Christine Gardarin (Université Clermont Auvergne)
26
271078 and Christel Marty (LBCM, Université Bretagne Sud) for providing technical support.
28

301079 **6. Ethics declarations**

321080 The study was conducted according to the Declaration of Helsinki and was approved by Ethics
33
341081 Research Committee of Biological Médical laboratory IBN ROCHD (Ghardaïa, Algeria),
35
36
371082 number 1154/He/Ce/Z/11/LSPSPC, 23 August 2017.
38

391083 **7. Conflict of interest**

41
421084 No conflicts of interest to declare.
43

441085 **8. References**

- 46
471086 [1] M. Rahikainen, R. Samson, B. Yang, Global production of macroalgae and uses as food,
48
491087 dietary supplements and food additives, GRASS. [https://www.submariner-](https://www.submariner-network.eu/images/grass/outputs/Seaweed_usage_GRASS_MRahikainen_final.pdf)
50
511088 [network.eu/images/grass/outputs/Seaweed_usage_GRASS_MRahikainen_final.pdf](https://www.submariner-network.eu/images/grass/outputs/Seaweed_usage_GRASS_MRahikainen_final.pdf), 2021.
52
53
541089 [2] F. Hadjkacem, G. Pierre, G. Christophe, J. Elleuch, I. Fendri, Z. Boual, S. Abdelkafi,
55
561090 Bioconversion of the Brown Tunisian Seaweed *Halopteris scoparia*: Application to Energy, J.
57
58
591091 Energy. 15 (12) (2022) 4342. <https://doi.org/10.3390/en15124342>.
60
61
62
63
64
65

- 1092 [3] L.S. Costa, G.P. Fidelis, S.L. Cordeiro, R.M. Oliveira, D.A. Sabry, R.B.G. Câmara, H.A.O.
1
21093 Rocha, Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds, Biomed.
3
4
51094 Pharmacother. 64 (1) (2010) 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.03.005>.
6
71095 [4] S. H. Wang, C. Y. Huang, C. Y. Chen, C. C. Chang, C. Y. Huang, C. D. Dong, J. S. Chang,
8
9
101096 Structure and biological activity analysis of fucoidan isolated from *Sargassum siliquosum*, ACS
11
121097 Omega 5 (50) (2020) 32447-32455. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04591>.
13
14
151098 [5] M.I. Bilan, A.A. Grachev, N.E. Ustuzhanina, A.S. Shashkov, N.E. Nifantiev, A.I. Usov, A
16
171099 highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L, Carbohydr.
18
191100 Res. 339 (3) (2004) 511-517. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.10.028>.
20
21
221101 [6] S. Sellimi, I. Younes, HB. Ayed, H. Maalej, V. Montero, M. Rinaudo, M. Nasri, Structural,
23
241102 physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown
25
26
271103 seaweed, Int. J. Biol. Macromol. 72 (2015) 1358-1367.
28
291104 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.016>.
30
31
321105 [7] S. Karuppusamy, G. Rajauria, S. Fitzpatrick, H. Lyons, H. McMahon, J. Curtin, C.
33
341106 O'Donnell. Biological Properties and Health-Promoting Functions of Laminarin, Mar.
35
361107 Drugs. 20 (12) (2022) 772. <https://doi.org/10.3390/md20120772>.
37
38
391108 [8] Y. Sharifuddin, Y. X. Chin, P. E. Lim & S. M. Phang, Potential bioactive compounds from
40
411109 seaweed for diabetes management, Mar. drugs. 13(8) (2015) 5447-5491.
42
43
441110 <https://doi.org/10.3390/md13085447>.
45
461111 [9] E. Apostolova, P. Lukova, A. Baldzhieva, P. Katsarov, M. Nikolova, I. Iliev, V. Kokova,
47
48
491112 Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of fucoidan, Polym. J. 12 (10) (2020) 2338.
50
511113 <https://doi.org/10.3390/polym12102338>.
52
53
541114 [10] L. Cunha, A. Grenha, Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in
55
561115 drug delivery applications, Mar. drugs. 14 (3) (2016) 42. <https://doi.org/10.3390/md14030042>.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1116 [11] J. Wang, S. Hu, S. Nie, Q. Yu, M. Xie, Reviews on Mechanisms of In Vitro Antioxidant
1
21117 Activity of Polysaccharides, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 13 (2016).
3
4
51118 <https://doi.org/10.1155/2016/5692852>
6
71119 [12] S. Bouissil, C. Guérin, J. Roche, P. Dubessay, Z. El Alaoui-Talibi, G. Pierre, C. El
8
9
101120 Modafar, Induction of defense gene expression and the resistance of date palm to *Fusarium*
11
121121 *oxysporum* f. sp. *albedinis* in response to alginate extracted from *Bifurcaria bifurcata*, *Mar.*
13
141122 *drugs.* 20 (2) (2022) 88. <https://doi.org/10.3390/md20020088>.
15
16
171123 [13] J. Poveda, A. Díez-Méndez, Use of Elicitors from Macroalgae and Microalgae in the
18
191124 Management of Pests and Diseases in Agriculture, *Phytoparasitica* (2022) 1-35.
20
21
221125 <https://doi.org/10.1007/s12600-022-01009-y>.
23
241126 [14] F. Hentati, C. Delattre, A. V. Ursu, J. Desbrières, D. Le Cerf, C. Gardarin, G. Pierre,
25
26
271127 Structural characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from the
28
291128 Tunisian brown seaweed *Cystoseira compressa*, *Carbohydr. Polym.* 198 (2018) 589-600.
30
31
321129 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.098>.
33
341130 [15] S. Ermakova, R. Men'shova, O. Vishchuk, S. M. Kim, B. H. Um, V. Isakov, T.
35
361131 Zvyagintseva, Water-soluble polysaccharides from the brown alga *Eisenia bicyclis*: Structural
37
38
391132 characteristics and antitumor activity, *Algal Res.* 2 (1) (2013) 51-58.
40
411133 <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.10.002>.
42
43
441134 [16] T.A. Davis, M. Ramirez, A. Mucci, B. Larsen. Extraction, isolation and cadmium binding
45
461135 of alginate from *Sargassum* spp, *J. Appl. Phycol.* 16 (2004) 275-284.
47
48
491136 [17] M. DuBois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.T. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for
50
511137 determination of sugars and related substances, *J. Anal. Chem.* 28 (3) (1956) 350-356.
52
53
541138 [18] M. Monsigny, C. Petit, AC. Roche, Colorimetric determination of neutral sugars by a
55
561139 resorcinol sulfuric acid micromethod, *Anal. Biochem.* 175 (2) (1988) 525-530.
57
581140 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90578-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90578-7).
59
60
61
62
63
64
65

- 1141 [19] N. Blumenkrantz, G. Asboe-Hansen, New method for quantitative determination of uronic
1
21142 acids, *Anal. Biochem.* 54 (2) (1973) 484-489.
3
4
51143 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90377-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90377-1).
6
71144 [20] J. Montreuil, G. Spik, A. Chosson, E. Segard, N. Scheppler, Methods of study of the
8
9
101145 structure of glycoproteins, *J. Pharm. Belg.* 18 (1963) 529-546.
11
121146 [21] M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities
13
141147 of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1-2) (1976) 248-
15
16
171148 254. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.10.013>.
18
191149 [22] K. S. Dodgson, R. G. Price, A note on the determination of the ester sulphate content of
20
21
221150 sulphated polysaccharides, *Anal. Biochem.* 84 (1) (1962) 106. Doi: 10.1042/bj0840106.
23
241151 [23] V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventós, Analysis of total phenols and other
25
26
271152 oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *Meth. Enzymol.* 299
28
291153 (1999) 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
30
31
321154 [24] G. Pierre, J.M. Zhao, F. Orvain, C. Dupuy, GL. Klein, M. Graber, T. Maugard, Seasonal
33
341155 dynamics of extracellular polymeric substances (EPS) in surface sediments of a diatom-
35
361156 dominated intertidal mudflat (Marennes–Oléron, France), *J. Sea Res.* 92 (2014) 26-35.
37
38
391157 <https://doi.org/10.1016/j.seares.2013.07.018>.
40
411158 [25] N.P. Chandia, B. Matsuhiro, A.E. Vásquez, Alginic acids in *Lessonia trabeculata*:
42
43
441159 characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy, *Carbohydr. Polym.* 46 (1)
45
461160 (2001) 81-87. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00286-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00286-1).
47
48
491161 [26] H. Grasdalen, High-field, ¹H-nmr spectroscopy of alginate: sequential structure and
50
511162 linkage conformations, *Carbohydr. Res.* 118 (1983) 255-260.
52
53
541163 [27] C. Delattre, G. Pierre, C. Gardarin, M. Traïkia, R. Elboutachfaiti, A. Isogai, P. Michaud,
55
561164 Antioxidant activities of a polyglucuronic acid sodium salt obtained from TEMPO-mediated
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1165 oxidation of xanthan, Carbohydr. Polym. 116 (2015) 34-41.
1
21166 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.054>.
3
4
51167 [28] R. Yan, S. L. Li, H. S. Chung, Y. K. Tam, G. Lin, Simultaneous quantification of 12
6
71168 bioactive components of Ligusticum chuanxiong Hort. by high-performance liquid
8
91169 chromatography, Pharm. Biomed. Anal. 37 (1) (2005) 87-95.
10
11
121170 <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.09.054>.
13
14
151171 [29] P. Carter, Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with
16
171172 a new reagent (ferrozine), Anal. Biochem. 40 (2) (1971) 450-458. <https://doi.org/10.1016/0003->
18
191173 [2697\(71\)90405-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90405-2).
20
21
221174 [30] W. Zhao-jing, L. Dian-hui, Extraction, Purification and Antioxidant Activities of
23
241175 Polysaccharide from Dioscorea nipponica Makino, J. Nat. Prod. 19 (1) (2007).
25
26
271176 [31] N.I. Osman, N.J. Sidik, A. Awal, N.A.M. Adam, N.I. Rezali, In vitro xanthine oxidase and
28
291177 albumin denaturation inhibition assay of *Barringtonia racemosa* L. and total phenolic content
30
311178 analysis for potential anti-inflammatory use in gouty arthritis. J. Intercult. Ethnopharmacol.
32
33
341179 5 (4) (2016) 343–349. Doi: 10.5455/jice.20160731025522.
35
361180 [32] S.J. Yoon, M.S. Pereira, M.S. Pavão, J.K. Hwang, Y.R. Pyun, P.A. Mourão, The
37
38
391181 medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated
40
411182 by heparin cofactor II, Thromb. Res. 106 (1) (2002) 51-58. <https://doi.org/10.1016/S0049->
42
431183 [3848\(02\)00071-3](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(02)00071-3).
44
45
461184 [33] N. Karaki, C. Sebaaly, N. Chahine, T. Faour, A. Zinchenko, S. Rachid, H. Kanaan, The
47
48
491185 antioxidant and anticoagulant activities of polysaccharides isolated from the brown algae
50
511186 *Dictyopteris polypodioides* growing on the Lebanese coast, J. Appl. Pharm. Sci. 3 (2) (2013)
52
531187 043-051. Doi: 10.7324/JAPS.2013.30208.
54
55
561188 [34] M. A. Ramakrishnan, Determination of 50% endpoint titer using a simple formula, World
57
581189 J. Virol. 5 (2) (2016) 85. Doi: 10.5501/wjv.v5.i2.85.
59
60
61
62
63
64
65

- 1190 [35] C. McLaren, M.N. Ellis, G. Hunter, A colorimetric assay for the measurement of the
1 sensitivity of herpes simplex viruses to antiviral agents, *Antiviral Res.* 3 (4) (1983) 223-234.
2 1191
3
4
5 1192 [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(83\)90001-3](https://doi.org/10.1016/0166-3542(83)90001-3).
6
7 1193 [36] M. Langlois, J.P. Allard, F. Nugier, M. Aymard, A rapid and automated colorimetric assay
8
9
10 1194 for evaluating the sensitivity of herpes simplex strains to antiviral drugs, *J. Biol. Stand.* 14 (3)
11
12 1195 (1986) 201-211. [https://doi.org/10.1016/0092-1157\(86\)90004-1](https://doi.org/10.1016/0092-1157(86)90004-1).
13
14 1196 [37] S. Bouissil, Z. El Alaoui-Talibi, G. Pierre, P. Michaud, C. El Modafar, C. Delattre, Use of
15
16
17 1197 alginate extracted from Moroccan brown algae to stimulate natural defense in date palm roots,
18
19 1198 *Mol.* 25 (3) (2020) 720. <https://doi.org/10.3390/molecules25030720>.
20
21
22 1199 [38] M. Aitouguinane, S. Bouissil, A. Mouhoub, H. Rchid, I. Fendri, S. Abdelkafi, C. Delattre,
23
24 1200 Induction of natural defenses in tomato seedlings by using alginate and oligoalginates
25
26
27 1201 derivatives extracted from Moroccan brown algae, *Mar. drugs.* 18 (10) (2020) 521.
28
29 1202 <https://doi.org/10.3390/md18100521>.
30
31
32 1203 [39] N.M. Hendrikse, A. Holmberg Larsson, S. Svensson Gelius, S. Kuprin, E. Nordling, P.O.
33
34 1204 Syrén, Exploring the therapeutic potential of modern and ancestral phenylalanine/tyrosine
35
36 1205 ammonia-lyases as supplementary treatment of hereditary tyrosinemia, *Sci. Rep.* 10 (1) (2020)
37
38
39 1206 1315. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57913-y>.
40
41 1207 [40] R. Budini, D. Tonelli, S. Girotti, Analysis of total phenols using the Prussian blue method,
42
43
44 1208 *J. Agric. Food Chem.* 28 (6) (1980) 1236-1238. Doi: 0021-8561 /80/1428-1236301.00/0 &cop.
45
46 1209 [41] S.B. Ghosh, A.K. Chandra, Production of thermostable alpha amylase by *Bacillus Apiarius*
47
48
49 1210 CBML 152, *Ferment. Technol.* (1981) 313-321. [https://doi.org/10.1016/B978-0-08-025385-](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-025385-5.50057-2)
50
51 1211 [5.50057-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-025385-5.50057-2)
52
53 1212 [42] M. Kunitz, Isolation of a crystalline protein compound of trypsin and of soybean trypsin-
54
55
56 1213 inhibitor, *J. Gen. Physiol.* 30 (4) (1947) 311. Doi: 10.1085/jgp.30.4.311
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1214 [43] Q. Zhang, P. Yu, Z. Li, H. Zhang, Z. Xu, P. Li, Antioxidant activities of sulfated
1
2 1215 polysaccharide fractions from *Porphyra haitanesis*, J. Appl. Phycol. 15 (2003) 305-310.
3
4
5 1216 [44] L. E. Rioux, S. L. Turgeon, M. Beaulieu, Characterization of polysaccharides extracted
6
7 1217 from brown seaweeds, Carbohydr. Polym. 69 (3) (2007) 530-537.
8
9
10 1218 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.01.009>.
11
12 1219 [45] A.O. Chizhov, A. Dell, H.R. Morris, S.M. Haslam, R.A. McDowell, A.S. Shashkov, A.I.
13
14 1220 Usov, A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*, Carbohydr. Res. 320 (1-2)
15
16 1221 (1999) 108-119. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00148-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00148-2).
17
18
19 1222 [46] F. Hentati, G. Pierre, A. V. Ursu, C. Vial, C. Delattre, S. Abdelkafi, P. Michaud,
20
21 1223 Rheological investigations of water-soluble polysaccharides from the Tunisian brown seaweed
22
23
24 1224 *Cystoseira compressa*, Food Hydrocoll. 103 (2020) 105631.
25
26
27 1225 [47] S. Sellimi, N. Kadri, V. Barragan-Montero, H. Laouer, M. Hajji, M. Nasri, Fucans from a
28
29 1226 Tunisian brown seaweed *Cystoseira barbata*: Structural characteristics and antioxidant activity,
30
31 1227 Int. J. Biol. Macromol. 66 (2014) 281-288. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.041>.
32
33
34 1228 [48] H.H. Ammar, J. Hafsa, D. Le Cerf, A. Bouraoui, H. Majdoub, Antioxidant and
35
36 1229 gastroprotective activities of polysaccharides from the tunisian brown algae, J Tunisian Chem.
37
38
39 1230 Soc. 18 (2016) 80-88.
40
41 1231 [49] S. Mabeau, & B. Kloareg. Isolation and analysis of the cell walls of brown algae: *Fucus*
42
43 1232 *spiralis*, *F. ceranoides*, *F. vesiculosus*, *F. serratus*, *Bifurcaria bifurcata* and *Laminaria digitate*,
44
45
46 1233 J. Exp. Bot. 38 (9) (1987) 1573-1580. <https://doi.org/10.1093/jxb/38.9.1573>.
47
48
49 1234 [50] M., Dammak, B. Hadrich, R. Miladi, M., Barkallah, F. Entati, R. Hachicha, S. Abdelkafi,
50
51 1235 Effects of nutritional conditions on growth and biochemical composition of *Tetraselmis* sp,
52
53 1236 Lipids Health Dis. 16 (1) (2017) 41. Doi: 10.1186/s12944-016-0378-1.
54
55
56 1237 [51] A. Synytsya, W. J. Kim, S. M. Kim, R. Pohl, A. Synytsya, F. Kvasnička, Y. I. Park,
57
58 1238 Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown
59
60
61
62
63
64
65

1239 seaweed *Undaria pinnatifida*, *Carbohydr. Polym.* 81 (1) (2010) 41-48.
1
21240 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.052>.
3
4
51241 [52] M. Sekkal, P. Legrand, A spectroscopic investigation of the carrageenans and agar in the
6
71242 1500-100 cm⁻¹ spectral range, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 49 (2) (1993)
8
91243 209-221. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(93\)80176-B](https://doi.org/10.1016/0584-8539(93)80176-B).
10
11
121244 [53] C. M. P. G. Dore, M. G. D. C. F. Alves, L. S. E. P. Will, T. G. Costa, D. A. Sabry, L. A.
13
141245 R. de Souza Rêgo, E. L. Leite, A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae
15
161246 *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory
17
181247 effects, *Carbohydr. Polym.* 91 (1) (2013) 467-475.
19
20
211248 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.075>.
22
23
241249 [54] F. Benaoun, C. Delattre, Z. Boual, AV Ursu, C. Vial, C. Gardarin, Pierre, G. Pierre,
25
261250 Structural characterization and rheological behavior of a heteroxylan extracted from *Plantago*
27
281251 *notata* Lagasca (Plantaginaceae) seeds, *Carbohydr. Polym.* 175 (2017) 96-104.
29
301252 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.056>.
31
32
331253 [55] T.A. Fenoradosoa, G. Ali, C. Delattre, C. Laroche, E. Petit, A. Wadouachi, P. Michaud,
34
351254 Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed *Sargassum*
36
371255 *turbinarioides* Grunow, *J. Appl. Phycol.* 22 (2010) 131-137.
38
391256 Doi: 10.1007/s10811-009-9432-y.
40
41
421257 [56] Q. L. Sun, Y. Li, L. Ni, Q. Li, Y. X. Cui, Y. S. Jiang, S. L. Dong, C. X, Structural
43
441258 characterization and antiviral activity of two fucoidans from the brown algae *Sargassum*
45
461259 *henslowianum*, *Carbohydr. Polym.* 229 (2020) 115487.
47
48
491260 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115487>.
50
51
521261 [57] M.M. Prokofjeva, T.I. Imbs, N.M. Shevchenko, P.V. Spirin, S. Horn, B. Fehse, V.S.
53
541262 Prassolov, Fucoidans as potential inhibitors of HIV-1. *Mar. Drugs.* 11 (8) (2013) 3000-3014.
55
561263 <https://doi.org/10.3390/md11083000>.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1264 [58] M.R. Torres, A.P. Sousa, E.A. Silva Filho, D.F. Melo, J.P. Feitosa, R.C. de Paula, M.G.
1
21265 Lima, Extraction and physicochemical characterization of Sargassum vulgare alginate from
3
4
51266 Brazil, Carbohydr. Res. 342 (14) (2007) 2067-2074.
6
71267 <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.05.022>.
8
9
101268 [59] N. Flórez-Fernández, J.F. Pontes, F. Guerreiro, I.T. Afonso, G. Lollo, M.D. Torres, A.
11
121269 Grenha, Fucoidan from Fucus vesiculosus: Evaluation of the Impact of the Sulphate Content
13
141270 on Nanoparticle Production and Cell Toxicity, Mar. Drugs. 21 (2) (2023) 115.
15
16
171271 <https://doi.org/10.3390/md21020115>.
18
191272 [60] B. Larsen, D.M. Alem, M.A Sallam, M.M. Mishrikey, A.I. Beltagy, Characterization of
20
21
221273 the alginates from algae harvested at the Egyptian Red Sea coast, Carbohydr. Res. 338 (22)
23
241274 (2003) 2325-2336. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(03\)00378-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00378-1).
25
26
271275 [61] E. Fourest, B. Volesky, Alginate properties and heavy metal biosorption by marine
28
291276 algae, Appl. Biochem. Biotechnol. 67 (1997) 215-226. Doi: 0273-2289/97/67034215511.00.
30
31
321277 [62] J. Ma, Y. Lin, X. Chen, B. Zhao, & J. Zhang, Flow behavior, thixotropy and dynamical
33
341278 viscoelasticity of sodium alginate aqueous solutions, Food Hydrocoll. 38 (2014) 119-128.
35
361279 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.016>.
37
38
391280 [63] A. Benchabane, & k. Bekkour, Rheological properties of carboxymethyl cellulose (CMC)
40
411281 solutions, Colloid Polym. Sci. 286 (10) (2008) 1173-1180.
42
43
441282 DOI 10.1007/s00396-008-1882-2
45
461283 [64] B. Mohanta, D.J. Sen, B. Mahanti, A.K. Nayak, Antioxidant potential of herbal
47
48
491284 polysaccharides: An overview on recent researches, J. Sens. (2022) 100158.
50
511285 <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2022.100158>.
52
53
541286 [65] I. C. Ferreira, P. Baptista, M. Vilas-Boas, L. Barros, Free-radical scavenging capacity and
55
561287 reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1288 activity, Food Chem. 100 (4) (2007) 1511-1516.
1
21289 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.043>.
3
4
51290 [66] C.Y. Huang, S.J. Wu, W.N. Yang, A.W. Kuan, C.Y. Chen, Antioxidant activities of crude
6
71291 extracts of fucoïdan extracted from *Sargassum glaucescens* by a compressional-puffing-
8
91292 hydrothermal extraction process, Food Chem. 197 (2016) 1121-1129.
10
11
121293 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.100>.
13
141294 [67] İ. Gülcin, Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine, J. Life Sci. 78 (8) (2006)
15
16803-811. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.103>.
171295
18
191296 [68] T. C. T. Lo, C. A. Chang, K. H. Chiu, P. K. Tsay, J. F. Jen, Correlation evaluation of
20
21antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of
221297 polysaccharide with different measuring methods, Carbohydr. Polym. 86(1) (2011) 320-327.
23
241298 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.056>.
25
261299
27
28
291300 [69] M.S. Arokiarajan, R. Thirunavukkarasu, J. Joseph, O. Ekaterina, W. Aruni, Advance
30
311301 research in biomedical applications on marine sulfated polysaccharide, Int. J. Biol. Macromol.
32
33194 (2022) 870-881. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.142>.
341302
35
361303 [70] X. Zhao, B. Li, C. Xue, L. Sun, Effect of molecular weight on the antioxidant property of
37
38low molecular weight alginate from *Laminaria japonica*, J. Appl. Phycol. 24 (2012) 295-300.
391304
40
411305 Doi: 10.1007/s10811-011-9679-y.
42
43
441306 [71] E. D. Obluchinskaya, O. N. Pozharitskaya, A. N. Shikov, In Vitro anti-inflammatory
45
461307 activities of fucoïdians from five species of brown seaweeds, Mar. Drugs. 20 (10) (2022) 606.
47
481308 <https://doi.org/10.3390/md20100606>.
49
50
511309 [73] K. Matsubara, Y. Matsuura, A. Bacic, ML. Liao, K. Hori, K. Miyazawa, Anticoagulant
52
531310 properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*,
54
55Int. J. Biol. Macromol. 28 (5) (2001) 395-399.
561311
57
581312 [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(01\)00137-4](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(01)00137-4).
59
60
61
62
63
64
65

- 1313 [72] S.K. Min, O.C. Kwon, S. Lee, K.H. Park, J.K. Kim, An antithrombotic fucoidan, unlike
1
2 1314 heparin, does not prolong bleeding time in a murine arterial thrombosis model: a comparative
3
4
5 1315 study of *Undaria pinnatifida* sporophylls and *Fucus vesiculosus*, *Phytother Res.* 26 (5) (2012)
6
7 1316 752-757. <https://doi.org/10.1002/ptr.3628>.
8
9
10 1317 [74] W. Jin, Q. Zhang, J. Wang, W. Zhang, A comparative study of the anticoagulant activities
11
12 1318 of eleven fucoidans, *Carbohydr. Polym.* 91 (1) (2013) 1-6.
13
14 1319 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.067>.
15
16
17 1320 [75] L. Fan, L. Jiang, Y. Xu, Y. Zhou, Y. Shen, W. Xie, J. Zhou, Synthesis and anticoagulant
18
19 1321 activity of sodium alginate sulfates, *Carbohydr. Polym.* 83 (4) (2011) 1797-1803.
20
21 1322 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.038>.
22
23
24 1323 [76] N. Zaharudin, A.A. Salmeán, L.O. Dragsted, Inhibitory effects of edible seaweeds,
25
26 1324 polyphenolics and alginates on the activities of porcine pancreatic α -amylase, *Food Chem.*
27
28 1325 245 (2018) 1196-1203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.027>.
29
30
31 1326 [77] D. Houghton, MD. Wilcox, PI. Chater, IA. Brownlee, CJ. Seal, JP. Pearson, Biological
32
33 1327 activity of alginate and its effect on pancreatic lipase inhibition as a potential treatment for
34
35 1328 obesity, *Food Hydrocolloids* 49 (2015) 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.019>.
36
37
38 1329 [78] HSA, Lu, J. Koh, W. Zhou, Structural dependence of sulfated polysaccharide for diabetes
39
40 1330 management: fucoidan from *Undaria pinnatifida* inhibiting α -glucosidase more strongly than
41
42 1331 α -amylase and amyloglucosidase, *Frontiers in Pharmacology* 11 (2020) 831.
43
44 1332 <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00831>.
45
46
47 1333 [79] Y. Wen, L. Gao, H. Zhou, C. Ai, X. Huang, M. Wang, C. Zhao, Opportunities and
48
49 1334 challenges of algal fucoidan for diabetes management, *Trends in Food Science & Technology*
50
51 1335 111 (2021) 628-641. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.028>.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1336 [80] PI. Chater, MD. Wilcox, IA. Brownlee, JP. Pearson, Alginate as a protease inhibitor in
1
2 1337 vitro and in a model gut system; selective inhibition of pepsin but not trypsin, Carbohydrate
3
4
5 1338 Polymers 131 (2015) 142-151. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.062>.
- 6
7 1339 [81] V. Strugala, EJ. Kennington, RJ. Campbell, G. Skjåk-Bræk, PW. Dettmar, Inhibition of
8
9
10 1340 pepsin activity by alginates in vitro and the effect of epimerization, International journal of
11
12 1341 pharmaceutics 304 (1-2) (2005) 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.07.017>.
- 13
14
15 1342 [82] F. Polticelli, P. Ascenzi, M. Bolognesi, B. Honig, Structural determinants of trypsin
16
17 1343 affinity and specificity for cationic inhibitors, Protein Science 8 (12) (1999) 2621-2629.
18
19 1344 <https://doi.org/10.1110/ps.8.12.2621>.
- 20
21
22 1345 [83] D.E. Jong, G. Hubertus, New Hunger Suppressing, J. Food Compos. Anal 082217 (2008).
- 23
24 1346 [84] G. Kulshreshtha, A.S. Burlot, C. Marty, A. Critchley, J. Hafting, G. Bedoux, B.
25
26
27 1347 Prithiviraj, Enzyme-assisted extraction of bioactive material from Chondrus crispus and
28
29 1348 Codium fragile and its effect on herpes simplex virus (HSV-1), Mar. drugs. 13 (01) (2015) 558-
30
31 1349 580. <https://doi.org/10.3390/md13010558>.
- 32
33
34 1350 [85] N. Bourgougnon, M. Lahaye, J. C. Chermann, J. M. Kornprobst, Composition and
35
36 1351 antiviral activities of a sulfated polysaccharide from Schizymenia dubyi (Rhodophyta,
37
38
39 1352 Gigartinales), *Bioorg. Med. Chem.* 3 (6) (1993) 1141-1146. <https://doi.org/10.1016/S0960->
40
41 1353 894X(00)80303-0.
- 42
43
44 1354 [86] Q.L. Sun, Y. Li, L.Q. Ni, Y.X. Li, Y.S. Cui, S.L. Jiang, C.X. Dong, Structural
45
46 1355 characterization and antiviral activity of two fucoidans from the brown algae Sargassum
47
48 1356 henslowianum, Carbohydr. Polym. 229 (2020) 115487.
49
50
51 1357 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115487>.
- 52
53
54 1358 [87] M. T. Ale, J. D. Mikkelsen, A. S. Meyer, Important determinants for fucoidan bioactivity:
55
56 1359 A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing
57
58 1360 sulfated polysaccharides from brown seaweeds, Mar. drugs. 9 (10) (2011) 2106-2130.
59
60
61
62
63
64
65

1361 <https://doi.org/10.3390/md9102106>.

1

21362

3

4

51363

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

Supplementary data

List of captions

Figure S1. PCR of genomic DNA (A) and associated cloning clusters (B).

Figure S2. Phylogenetic tree for *Halopteris scoparia* based on 18S marker (A), LSU (B) and Rbcl (C) sequences.

Figure S3. ^1H NMR spectrum of AHS.

Figure S4. SEC-MALS spectra of AHS (A) and FHS (B). The chromatographic profiles (1) and the distributions in molar masses (2) have been plotted.

Figure S5. Flow behavior of AHS solutions at different concentrations ranging from 0.0125% to 2.5 % (w/v) at 25 °C.

Figure S6. Steady-shear flow curves for aqueous AHS solutions ranging from 0.5% to 2.5 % at different temperatures ranging. (25°C (A), 40°C (B) and 60°C (C).

Figure S7. Storage modulus (G'), loss modulus (G'') vs. angular frequency ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$) for solutions of different concentration of CCSA at 25 °C in water.

Figure S8. The influence of divalent salt CaCl_2 at 25 °C on the flow apparent viscosity.

Figure S9. Critical overlap (C^*) and aggregating (C^{**}) concentrations obtained from the log-log plot of the specific viscosity (η_{sp}) vs the concentration of AHS in water at 25 °C.

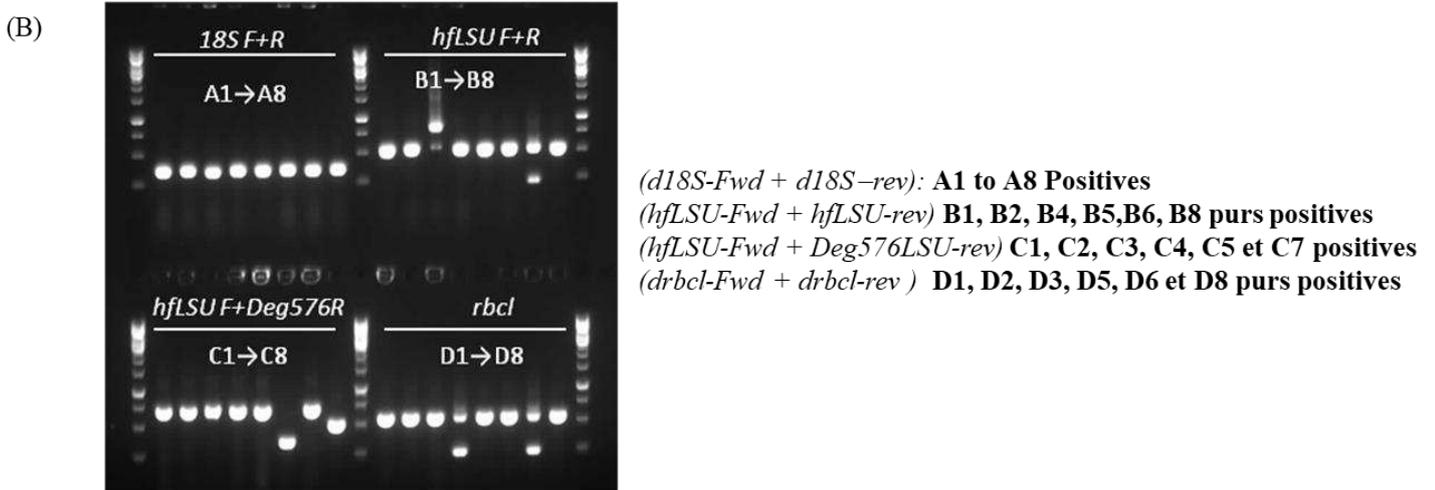
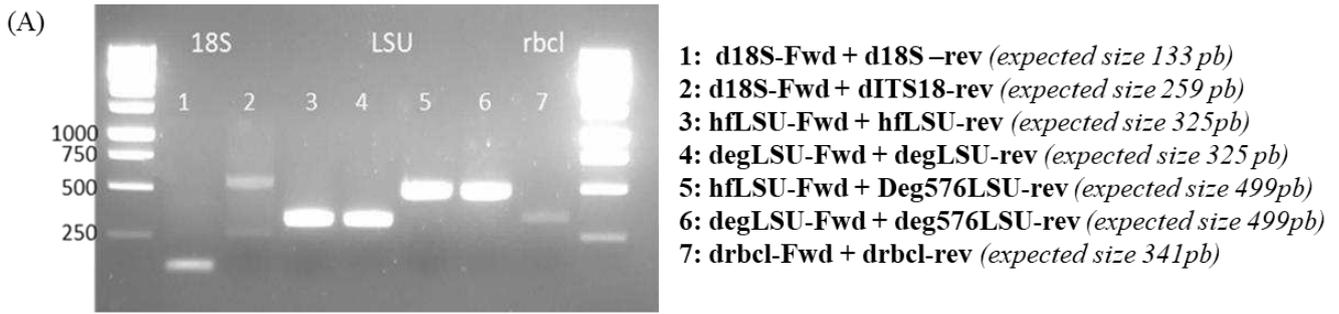
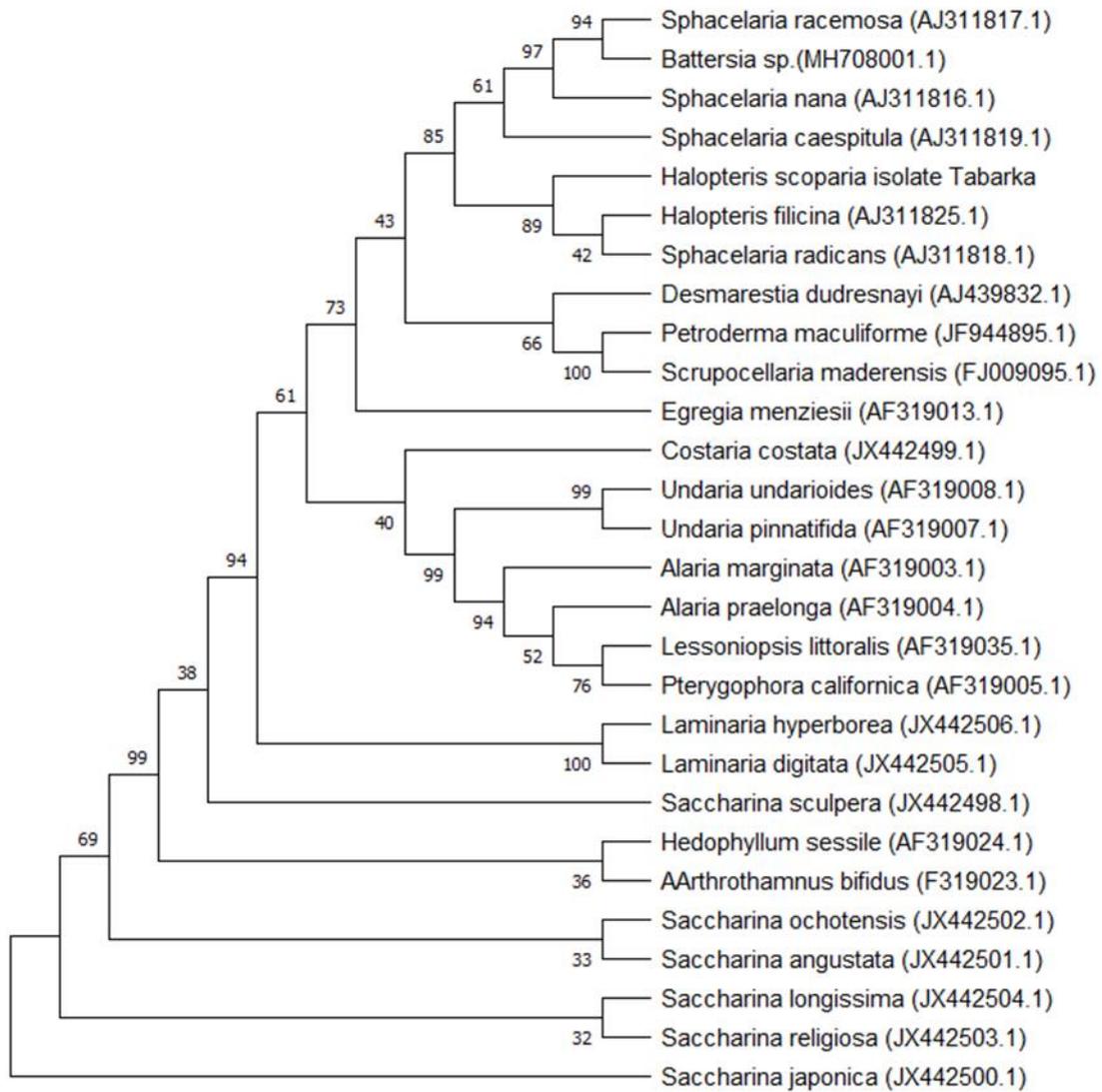
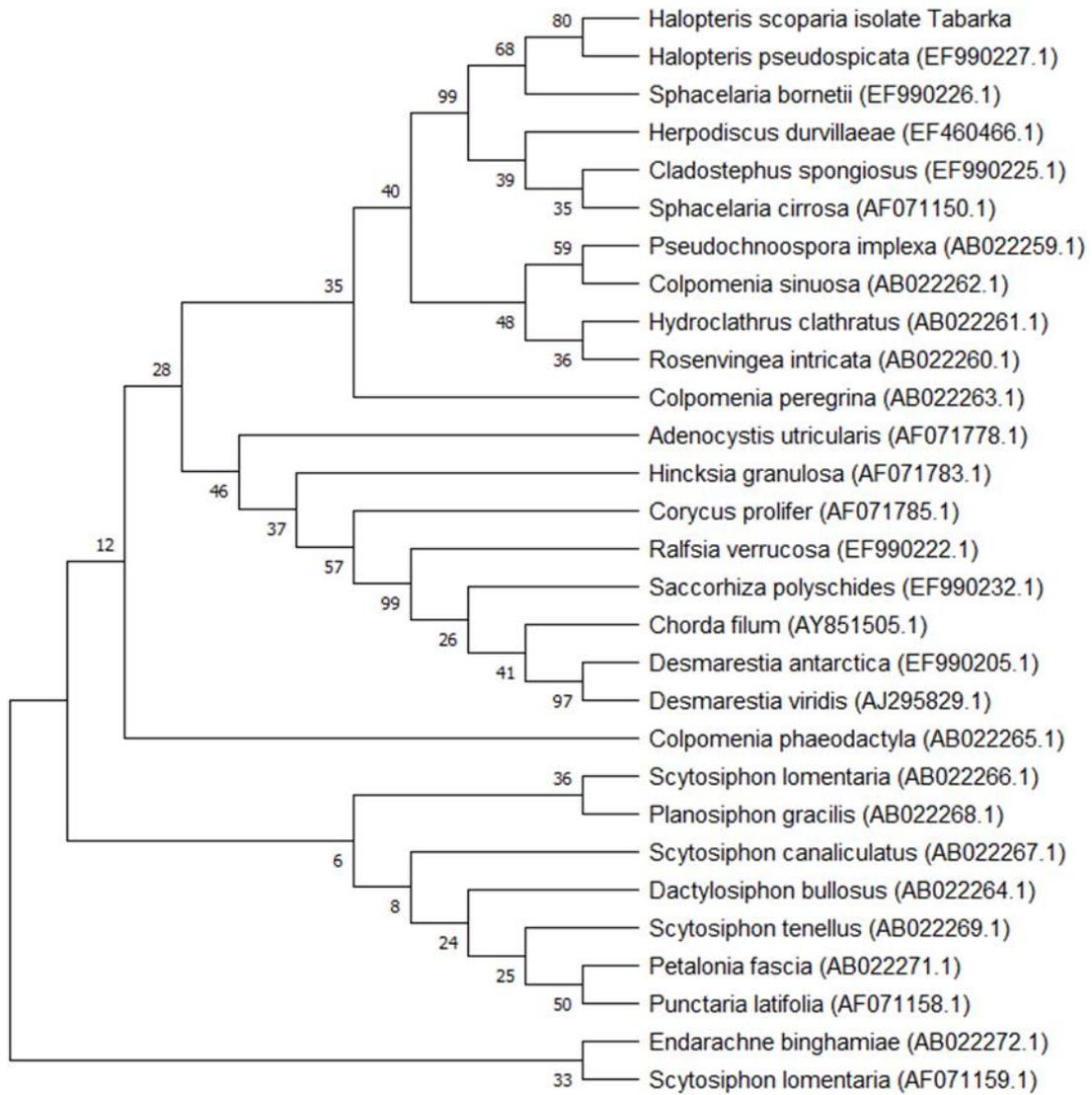


Figure S1. PCR of genomic DNA (A) and associated cloning clusters (B).

(A)



(B)



(C)

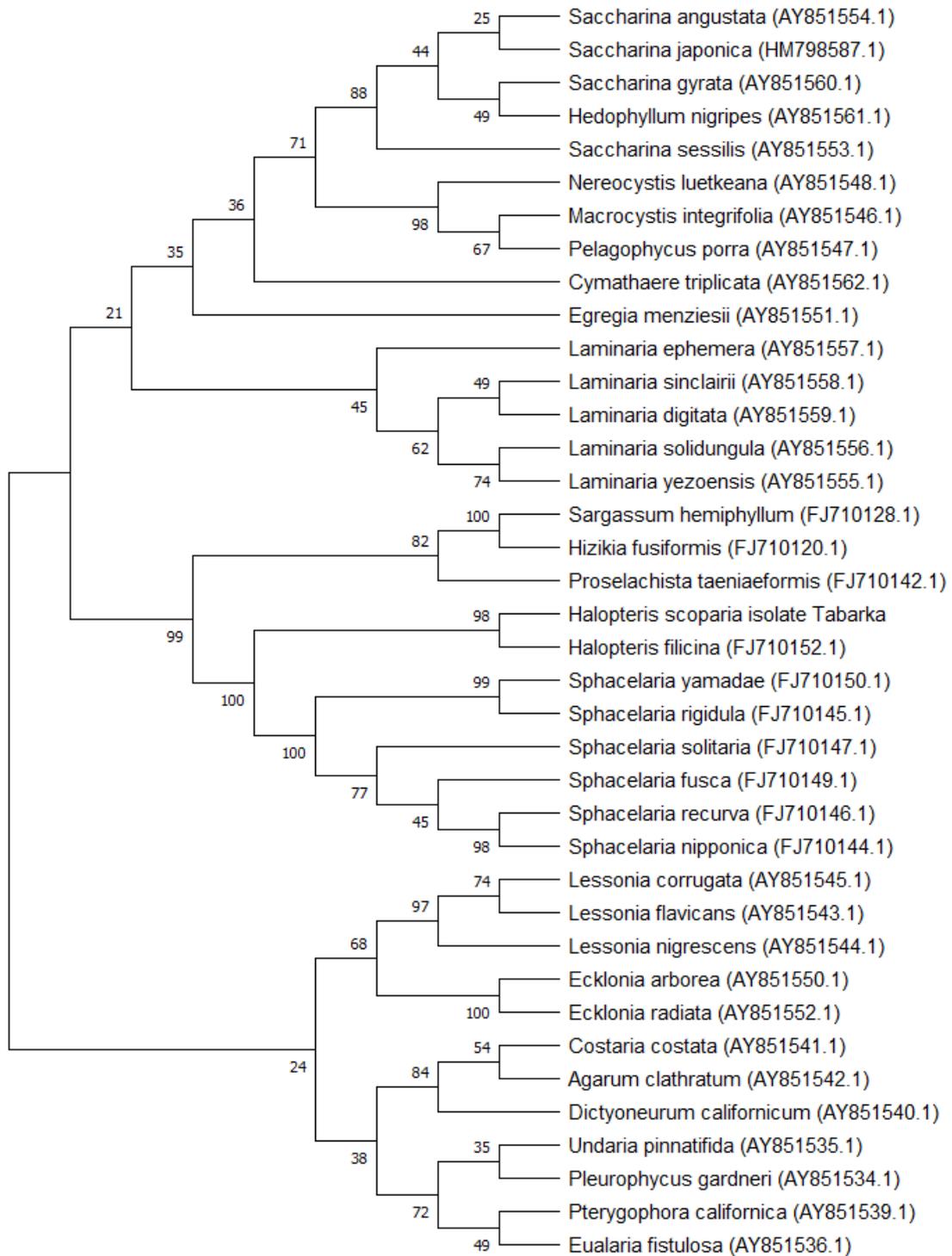


Figure S2. Phylogenetic tree for *Halopteris scoparia* based on 18S marker (A), LSU (B) and Rbcl (C) sequences.

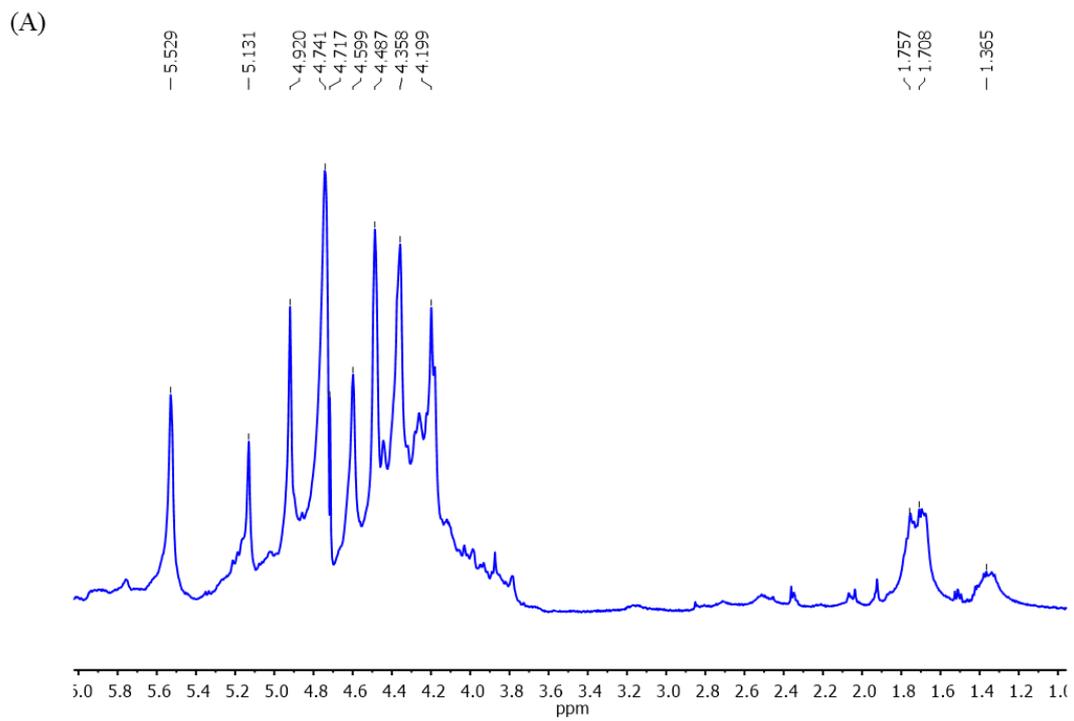


Figure S3. ^1H (A) NMR spectrum of AHS.

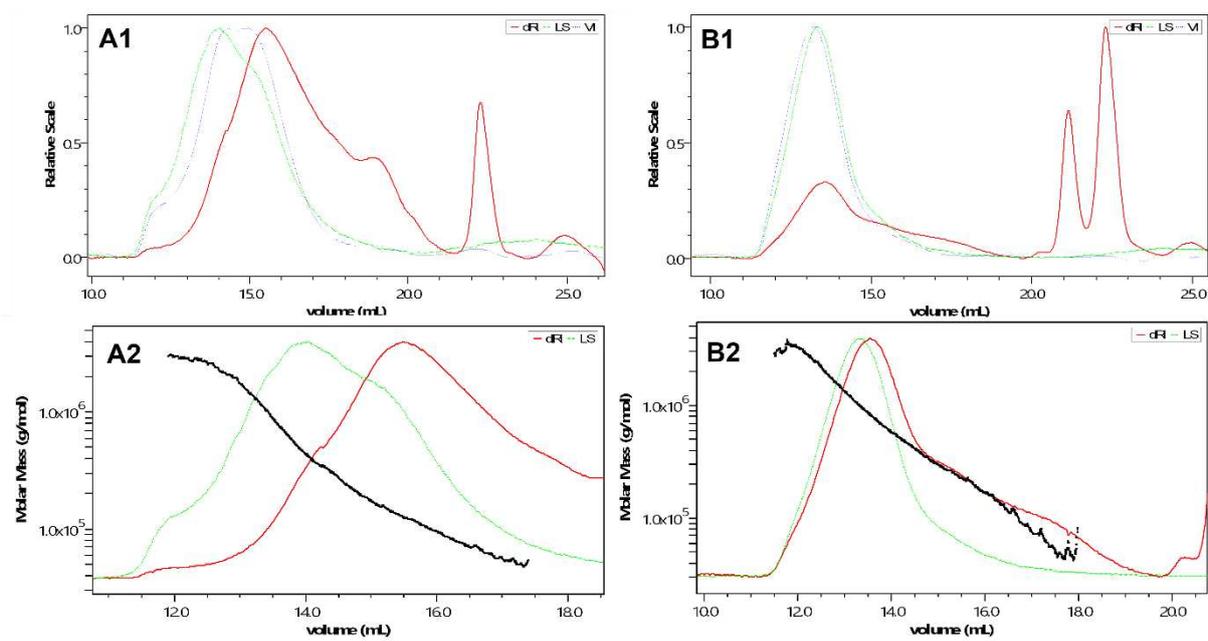


Figure S4. SEC-MALS spectra of AHS (**A**) and FHS (**B**). The chromatographic profiles (1) and the distributions in molar masses (2) have been plotted.

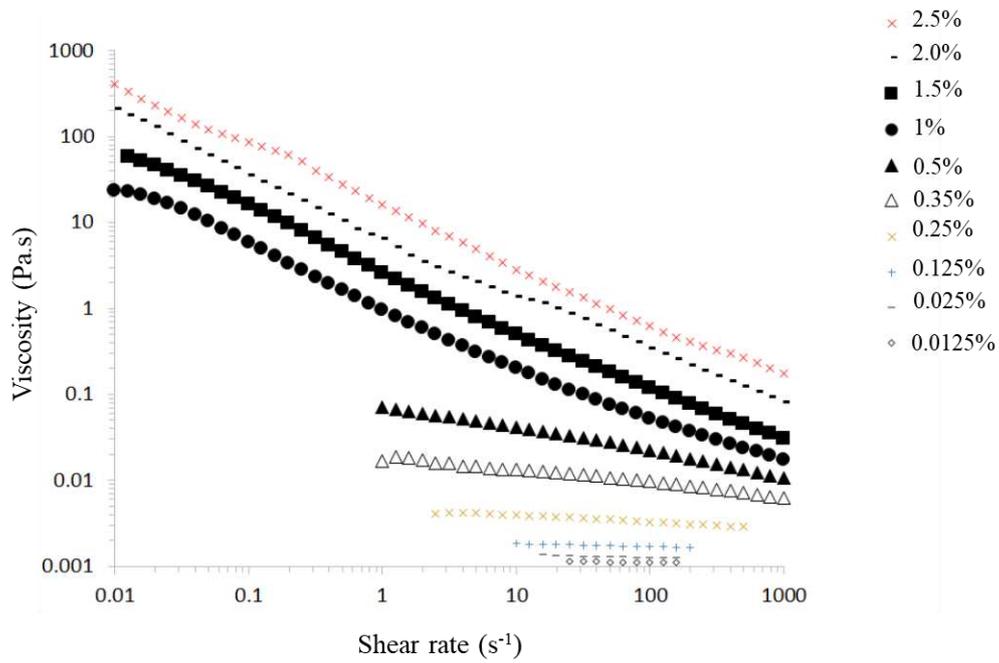


Figure S5. Flow behavior of AHS solutions at different concentrations ranging from 0.0125 to 2.5 % (w/v) at 25 °C.

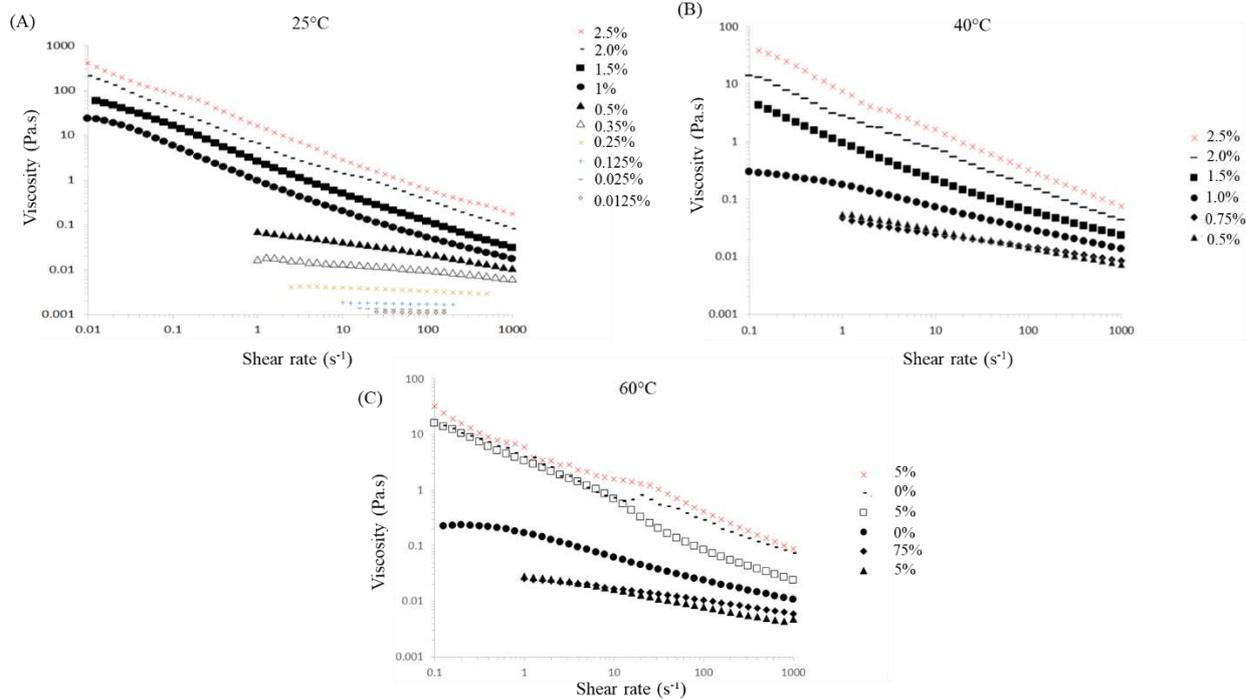


Figure S6. Steady-shear flow curves for aqueous AHS solutions ranging from 0.5% to 2.5 % at different temperatures ranging. (25°C (A), 40°C (B) and 60°C (C))

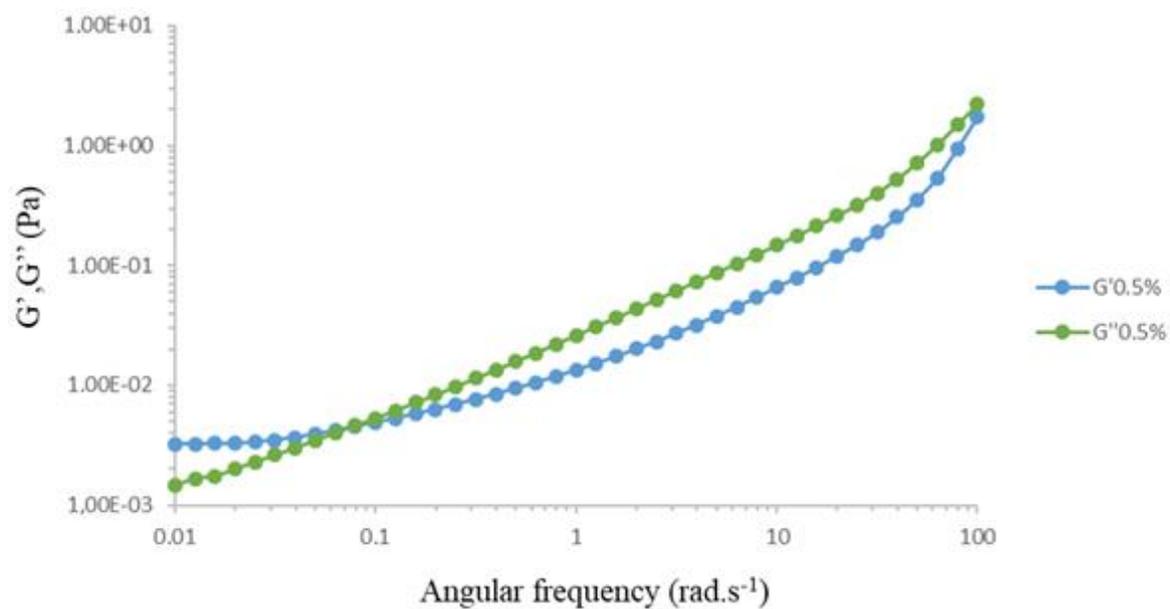


Figure S7. Storage modulus (G'), loss modulus (G'') vs. angular frequency ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$) for solutions of different concentration of CCSA at 25 °C in water.

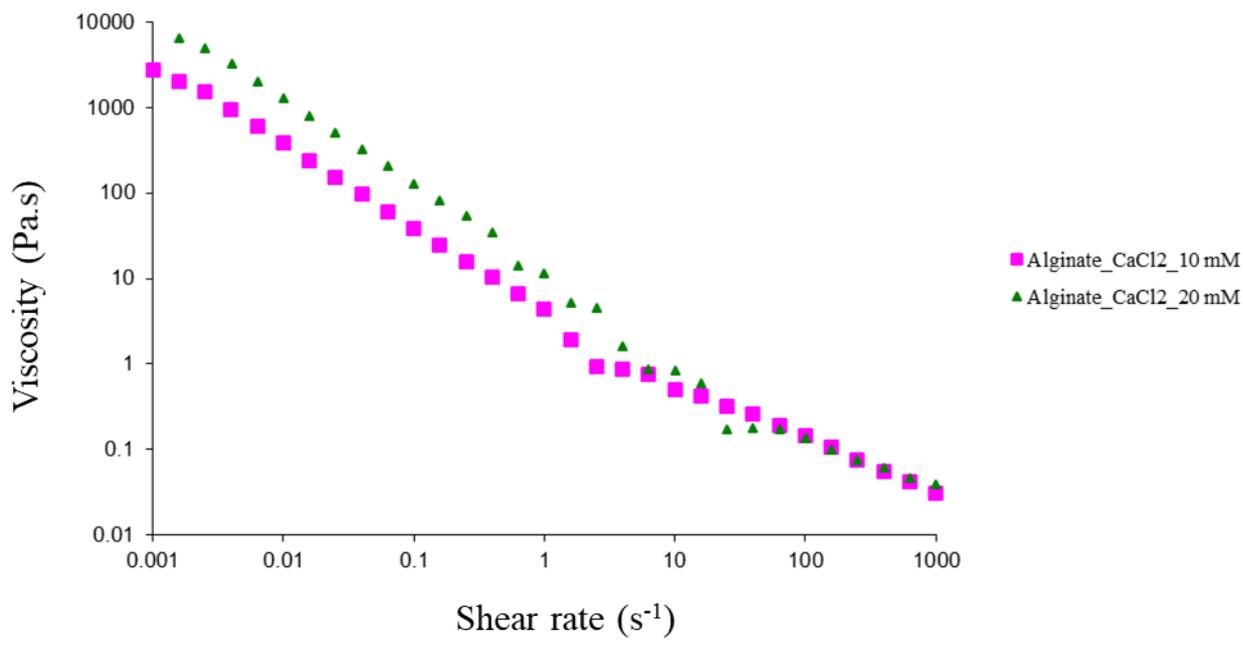


Figure S8. The influence of divalent salt CaCl₂ at 25 °C on the flow apparent viscosity.

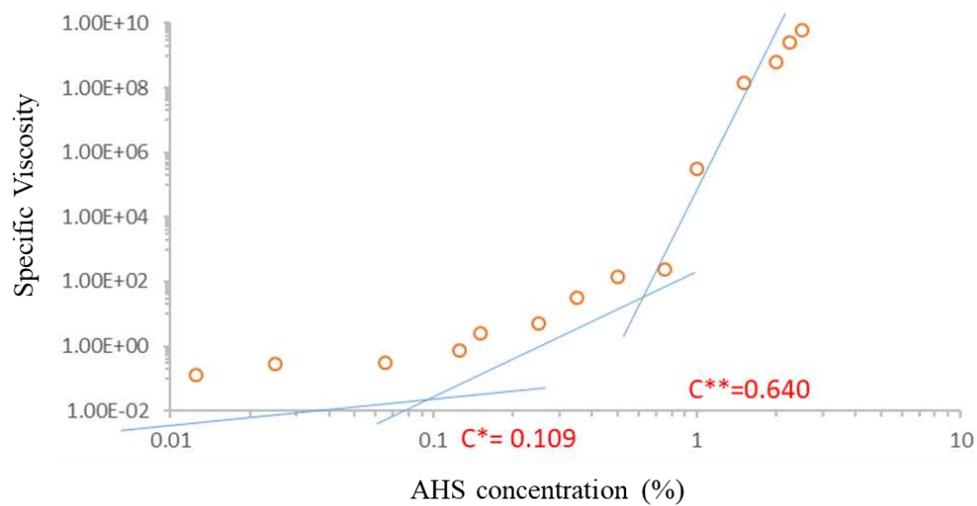


Figure S9. Critical overlap (C^*) and aggregating (C^{**}) concentrations obtained from the log-log plot of the specific viscosity (η_{sp}) vs the concentration of AHS in water at 25 °C.

CHAPITRE 2 :

Production et purification des fucoxanthines et du β -carotènes de *H. scoparia* et leurs effets sur des enzymes digestives et quelques bactéries pathogènes

ARTICLE 2 :

Farah hadjkacem, Jihen Elleuch, Guillaume Pierre, Imen Fendri, Philippe Michaud & Slim Abdelkafi (2023). Production and purification of fucoxanthins and β -carotenes from *Halopteris scoparia* and their effects on digestive enzymes and harmful bacteria.

Avec les changements rapides dans les modes de vie et l'évolution des habitudes alimentaires, les facteurs de risque conduisant à des perturbations métaboliques se sont multipliés tel que l'obésité, l'hypertension et l'hyperglycémie. Ces pathologies sont devenues une préoccupation majeure de notre société moderne. Le diabète est considéré comme l'une des plus grandes crises sanitaires du 21^{ème} siècle. Selon l'OMS, plus de 220 millions personnes souffrent du diabète et ce nombre devrait augmenter pour atteindre environ 366 millions d'ici 2030 (Gutierrez & Martha, 2016). Cette maladie représente la 6^{ème} cause de décès à l'échelle mondiale. La prévalence globale du diabète est estimée à 10,2% de la population mondiale en 203, le diabète de type 2 (DT2) correspondant à 90% des cas. Il s'agit d'une maladie observée chez les personnes âgées, et de plus en plus chez des sujets jeunes.

Retarder l'absorption du glucose en inhibant les activités des enzymes digestives glucidiques est considérée comme une stratégie de gestion efficace du DT2 (Gutierrez & Martha, 2016). Les α -amylases sont des enzymes clés liées à la digestion de l'amidon alimentaire chez l'Homme. Produites dans les glandes salivaires et le pancréas, elles hydrolysent l'amidon dans le tractus digestif de la bouche à l'intestin grêle en oligosaccharides et disaccharides. L'inhibition de l'activité enzymatique de ces α -amylases pourrait ralentir le taux d'hydrolyse de l'amidon permettant ainsi le contrôle de l'hyperglycémie post-prandiale. Le contrôle de la digestibilité des glucides par l'inhibition des activités des enzymes digestives comme l'amidon (α -amylase) semble une stratégie alternative potentiellement efficace pour contrôler l'hyperglycémie postprandiale (Li et al., 2022). Des études récentes ont rapporté que les inhibiteurs de la trypsine peuvent améliorer indirectement le métabolisme des glucides dans le cas de diabète (Cristina Oliveira de Lima et al., 2019). L'inhibition de la trypsine fait partie des thérapies qui contribue à la diminution de l'indice glycémique tout en modérant le rapport insuline : glucose (Ihse et al., 1976). Au cours des dernières décennies, les inhibiteurs synthétiques ont été administrés en tant que médicaments hypoglycémiant oraux et sont considérés comme les produits pharmaceutiques les plus efficaces pour la lutte contre le DT2. L'acarbose, le miglitol et le voglibose sont des inhibiteurs importants utilisés dans le traitement clinique, mais leur utilisation est discutable en raison de leurs effets indésirables, comme la distension abdominale, les flatulences, le météorisme et l'augmentation d'épisodes diarrhéiques (Usman et al., 2019). En outre, les patients diabétiques peuvent développer une résistance aux médicaments actuellement disponibles. Diversifier le pool d'inhibiteurs est donc nécessaire pour élargir les options de traitement.

Les composés d'origine naturelle peuvent jouer ce rôle. Il a été prouvé que certains poly- et oligosaccharides, des peptides, des composés lipidiques non amylicés et des pigments d'origine macroalgale sont capables d'inhiber significativement l'activité de l' α -amylase. Des effets inhibiteurs contre la trypsine ont également été rapportés (Gong et al., 2020 ; Ihse et al., 1976). Riches en polysaccharides, protéines et pigments (chlorophylles, caroténoïdes et xanthophylles), les macroalgues brunes pourraient être utiles dans cette recherche d'alternatives aux traitements actuels. La macroalgue *H. scoparia* est caractérisée par sa composition importante en caroténoïdes et en xanthophylles (fucoxanthine, β -carotène). Ces pigments ont été extraits en adoptant une procédure conventionnelle à l'aide de solvants organiques, puis purifiés par des méthodes chromatographiques. Leurs effets inhibiteurs sur les enzymes digestives ont été étudiés. Parallèlement, nous avons évalué leurs activités antibactériennes contre des germes responsables de gastro-entérites. Les résultats obtenus ont montré qu'aussi bien la fucoxanthine (P-FX) que le β -carotène (P-CT) présentent des effets inhibiteurs contre l' α -amylase et la trypsine, ce qui est en faveur de l'effet protecteur de ces deux pigments purifiés contre le diabète type 2, en réduisant la glycémie. Les valeurs (CI_{50}) d'inhibition de l' α -amylase mesurées ont atteint respectivement 300 $\mu\text{g/mL}$ et 500 $\mu\text{g/mL}$ pour les extraits enrichis en fucoxanthine (P-FX) et en β -carotène (P-CT). Des activités importantes d'inhibition de la trypsine ont été observées avec un CI_{50} de l'ordre de 800 $\mu\text{g/mL}$ pour les deux pigments, comparables aux contrôles classiquement utilisés dans ce type de test possèdent des CI_{50} d'environ 850 et 900 $\mu\text{g/mL}$ pour le fucoxanthine (P-FX) et β -carotène (P-CT), respectivement.

En parallèle, le potentiel antibactérien des pigments purifiés a été évalué. La fraction enrichie en β -carotène s'est avérée un excellent agent antibactérien naturel actif contre des bactéries à coloration de Gram positif et Gram négatif telles que *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *S. aureus* (ATCC 6538) et *S. enterica* (ATCC 14028) avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 0,225, 0,1125, 0,225 $\mu\text{g/mL}$, respectivement.

Les résultats ainsi obtenus sont **en faveur de l'exploitation des pigments** de *H. scoparia* dans les domaines thérapeutiques comme source potentielle de molécules inhibitrices de l' α -amylase et de la trypsine ainsi que comme agents antibactériens contre diverses bactéries pathogènes responsables d'infections gastro-intestinales.

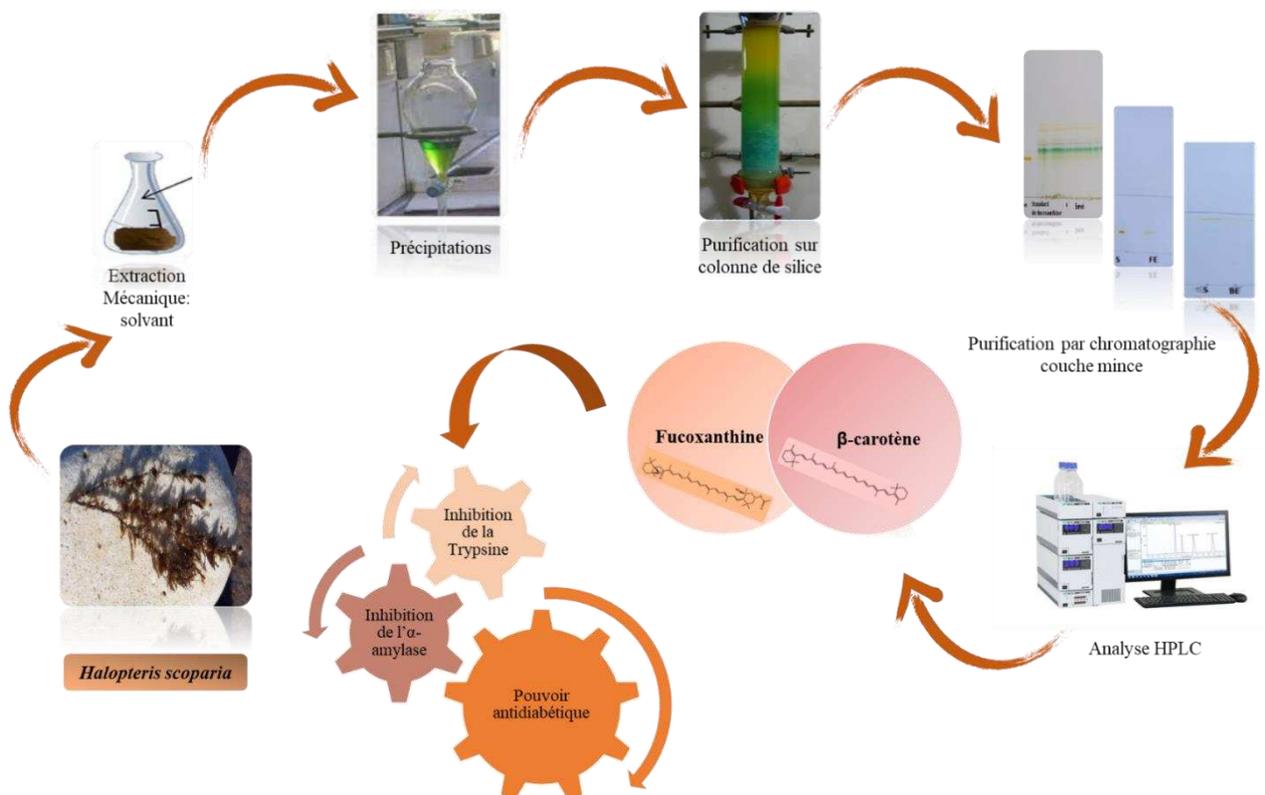
ARTICLE 2

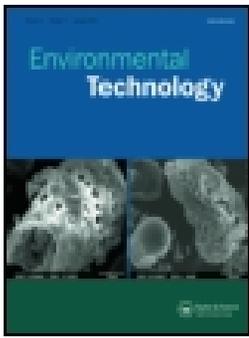
Production and purification of fucoxanthins and β -carotenes from *Halopteris scoparia* and their effects on digestive enzymes and harmful bacteria

Farah Hadjkacem^{1,2}, Jihen Elleuch¹, Guillaume Pierre², Imen Fendri³, Philippe Michaud²
and Slim Abdelkafi^{1,*}

Environmental Technology (2023)

IF₂₀₂₃ = 3,4





Production and purification of fucoxanthins and β -carotenes from *Halopteris scoparia* and their effects on digestive enzymes and harmful bacteria

Farah Hadjkacem, Jihen Elleuch, Guillaume Pierre, Imen Fendri, Philippe Michaud & Slim Abdelkafi

To cite this article: Farah Hadjkacem, Jihen Elleuch, Guillaume Pierre, Imen Fendri, Philippe Michaud & Slim Abdelkafi (2023): Production and purification of fucoxanthins and β -carotenes from *Halopteris scoparia* and their effects on digestive enzymes and harmful bacteria, *Environmental Technology*, DOI: [10.1080/09593330.2023.2195562](https://doi.org/10.1080/09593330.2023.2195562)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09593330.2023.2195562>



Published online: 05 Apr 2023.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 27



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Production and purification of fucoxanthins and β -carotenes from *Halopteris scoparia* and their effects on digestive enzymes and harmful bacteria

Farah Hadjkacem^{a,b}, Jihen Elleuch^a, Guillaume Pierre^b, Imen Fendri^c, Philippe Michaud^b and Slim Abdelkafi^a

^aLaboratoire de Génie Enzymatique et Microbiologie, Equipe de Biotechnologie des Algues, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, University of Sfax, Sfax, Tunisia; ^bUniversité Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut Pascal, Clermont-Ferrand, France; ^cLaboratoire de Biotechnologie de Plantes Appliquée à l'Amélioration de Cultures, Faculté des Sciences de Sfax, Université de Sfax, Sfax, Tunisia

ABSTRACT

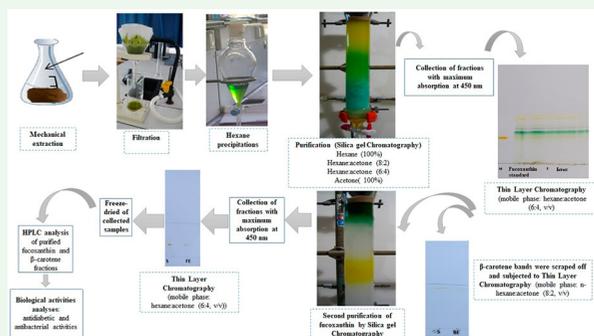
Algae constitute a significant part of marine biodiversity. They represent a renewable source of bioactive metabolites from drug development and therapeutic fields. Fucoxanthin and β -carotene from the brown macroalgae *Halopteris scoparia*, were extracted using conventional organic solvent extraction, then purified, to homogeneity, based on various chromatographic principles. Their effects on digestive enzymes and harmful bacteria were investigated. The capacities of both purified pigments to inhibit α -amylase and trypsin enzymes were evaluated. Purified fucoxanthin and β -carotene exhibited interesting α -amylase inhibition activities, with IC_{50} of 300 and 500 μ g/mL, respectively. Moreover, trypsin inhibition activities were detected using purified these two pigments. The antibacterial potential of the purified pigments was evaluated. β -carotene showed to be a great antibacterial natural compound against gram-positive and gram-negative bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* with Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of about 0.225, 0.1125, 0.225 μ g/mL, respectively. Those findings are in favor of the exploitation of *H. scoparia* pigments in therapeutic fields as an antidiabetic source directly by the inhibition of α -amylase and trypsin as well as antibacterial agents against gastrointestinal infections.

ARTICLE HISTORY

Received 27 October 2022
Accepted 27 February 2023

KEYWORDS

Macroalgae; Fucoxanthin; β -carotene; *Halopteris*; Digestive enzymes



1. Introduction

Nowadays, chronic diabetes is becoming the most endocrine health problem in the world. The number of diabetic patients is likely to reach 300 million by 2025 according to the World Health Organization (WHO) [1]. Currently, North Africa has the second-highest rate of diabetes mellitus growth in the world [2]. This rapid development is projected to grow by 96.2% in 2035 [3]. One of the most significant public health issues in Tunisia is the diabetic syndrome [4]. It refers to the disturbance of carbohydrate, fat, and protein metabolism caused by abnormal glucose metabolism and difficulty

in insulin secretion, which eventually leads to chronic hyperglycemia and various other complications such as damage to the nervous system, kidneys, eyes, heart, feet, and skin [2,5,6]. Diabetes may be classified into two groups based on etiology. Type 1 diabetes, known as insulin-dependent diabetes mellitus, is characterized by absolute insulin deficiency due to the destruction of pancreatic β -cells that normally secrete it. Type 2 diabetes is characterized insulin resistance and/or insulin deficiency leading to excessive glucose concentration in blood. It is often developed by patients with physical activity, and obesity. Administration of insulin or other

oral hypoglycemic agents, are current therapies for type 2 ineffective in some cases [7,8]. Therefore, there is an increasing demand for innovative alternatives based on the utilization of natural compounds with minimal or no adverse impact on patients. Plant-based resources are safety and effective in various applications [7]. To date, the WHO considers 119 plants as resources for therapeutic compounds, of which about 74% are used in modern medicine [9,10]. In contrast, the identification of natural ingredients and the isolation of active chemicals from underutilized marine organisms, especially macroalgae, is still poorly explored despite their potential. Brown seaweeds are rich in bioactive metabolites particularly soluble dietary fibers, sulfated polysaccharides, phlorotannins, peptides, sulfolipids, polyunsaturated fatty acids, vitamins, minerals, and pigments [11]. Carotenoids are a diverse group of natural pigments that play an important role in photosynthesis. They are defined as polyenes composed of 11 conjugated double bonds and two γ -ionone rings on each end [12]. The main groups of these hydrocarbons are carotenoids. Xanthophylls are polar oxygenated groups representing a subset carotenoid. Because of their conjugated double-bond structure, carotenoids are sensitive to isomerization and oxidation [13]. 700 carotenoids are found in nature, of which, zeaxanthin, violaxanthin, lutein, β -carotene, and fucoxanthin are the most common in seaweed [14].

Fucoxanthin, called 3'-acetoxo-5,6-epoxy-3,5'-dihydroxy-6',7'-didehydro-5,6,7,8,5',6'-hexahydro-carotene-8-one, is a xanthophyll found in brown algae (Phaeophyceae). It has a specific chemical structure including a distinct allenic link as well as various oxygenic functional moieties such as epoxide, hydroxyl, carbonyl and carboxyl groups [15].

Fucoxanthin plays a crucial role in the protein-pigment network of fucoxanthin-chlorophyll *a/c*-binding protein complexes (FCPs) as a light-harvesting pigment for photosynthesis. FCPs allow the gathering of blue-green light above water and the effective quenching of surplus energy, providing algae with excellent light-harvesting and photo-protection capacities [16,17]. Recently, fucoxanthin has been proven to have a wide range of biological characteristics [17]. Fucoxanthin influences lipid metabolism and has been shown to have anti-obesity and anti-diabetic effects. Fucoxanthin, is considered as a commercial product that has a broad spectrum of health benefits, notably due to its antidiabetic and antibacterial effects [18]. In fact, beneficial effects of fucoxanthin on weight reduction, insulin resistance, and blood glucose levels were reported. Market demand stimulates the development of its diverse production methods.

β -carotene, with the molecular formula $C_{40}H_{56}$, is the most common form of carotene in plants. Its isolation from fruits is commonly done using column chromatography [19]. It was also being extracted from microalgae, mainly *Dunaliella salina*. The purification of β -carotene from other carotenoids is based on the polarity. In fact, β -carotene is a very lipophilic non-polar compound [18]. β -carotene is known for its ability to protect against a range of diseases including type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease, and obesity [18]. Nowadays β -carotene is mainly produced through chemical synthesis but quite recently, biotechnology makes a great approach toward β -carotene from natural origin [20].

One of the therapies for treating diabetes is to decrease carbohydrate digestion by inhibiting the action of α -amylase, which decreases intestinal glucose consumption and postprandial blood glucose levels [7]. In addition, trypsin inhibitors can indirectly enhance carbohydrate metabolism in diabetic states and decrease blood glucose levels moderating the ratio of insulin/glucose [21]. It has been reported that α -amylase and trypsin enzymes inhibition, in diabetic rats, has an impact on blood sugar without having an effect on the endocrine function of the pancreas [22]. Otherwise, carotenoids have antibacterial activities [23]. Those compounds enhance cell membrane permeability and consequently cytoplasm leakage [24].

Fucoxanthin and β -carotene can link some protein receptors or nucleic acids leading to their inhibition [23,25]. They can also change efflux protein conformation [23,25]. The aim of this work was the analysis of fucoxanthin and β -carotene contents from the brown macroalgae *H. scoparia*. Extraction and purification of both pigments were conducted through chromatography methods combination. The inhibitory effects of isolated macroalgal pigments on α -amylase and trypsin were determined to utilize them as a dietary supplement. Further, the antibacterial activities of fucoxanthin and β -carotene against bacteria were evaluated for their potential exploitation in therapeutic fields.

2. Material and methods

2.1. *H. scoparia* sample preparation

Macroalga biomass was collected in February 2020 from Tabarka, located in the northwest region of Tunisia (36° 57' 36.223" N and 8° 45' 12.018" E). Identification was conducted *via* morphological observation of the macroalga with guidance from online database (<https://www.algaebase.org/browse/taxonomy/>). After being

harvested, the thalli were cleaned with distilled water to remove salts. Algae were then dried for 20 days at 50°C [26]. Using a blender, the dried materials were crushed into powder with a particle size of 16–40 µm (Moulinex, France). This item was labeled as raw seaweed and was abbreviated as 'RSF' (Raw Seaweed Fraction).

2.2. Pigments extraction

RSF samples were soaked in pure methanol (50% w/v) and kept under agitation at 250 rpm for 48 h in the dark at room temperature. Each extract was filtered using Wattman No.1 filter. The operation was repeated several times until a colorless seaweed powder was obtained.

All extracts were mixed to form a crude fraction and dried using a rotary evaporator at 40 °C with 337 mbar (BUCHI, Recirculating Chiller F-100). A mixture of hexane and distilled water (1:1) (v/v) was added to the crude fraction. The top layer (hexane) was collected and supplemented with chloroform at the ratio (1:0.5) (V/V). The mixture was then centrifuged (5,000 x g) for 15 min at room temperature. The organic layer was kept and dried using a rotary evaporator at 40 °C with 337 mbar (BUCHI, Recirculating Chiller F-100). The extract was then freeze-dried again to eliminate the remaining traces of chloroform [27].

2.2.1. Purification of fucoxanthin and β-carotene by silica gel column chromatography

Ten milligrams of the freeze-dried sample were dissolved in pure methanol, and then 5 mL were deposited in a column (30 cm × 25 mm) of gel silica (230–400 mesh) combined with n-hexane. Elution was carried out using solvents of increasing polarity: First elution was carried out with 200 mL of pure hexane as the mobile phase. The column was then eluted using 200 mL of n-hexane:acetone (8:2, v/v). Ten fractions of 20 mL were collected. After that 300 mL of n-hexane:acetone (6:4, v/v) were used to elute fucoxanthin and also β-carotene. Ten fractions of 30 mL were collected. Finally, four hundred mL of acetone were added and Ten fractions of 40 mL were collected. The absorbance at 450 nm of each collected fraction was measured. From each elution step, fractions that had absorbance values ranging from 1 Do unit to 1.5 Do unit were mixed and dried using a rotary evaporator at 40 °C and then freeze-dried. Purified fractions were re-introduced into the silica column to improve its purity, and by following the same steps described above. Purified fractions were dried with a rotary evaporator and then freeze-dried overnight [28].

2.2.2. Thin layer chromatography (TLC)

TLC using silica plates (10 × 5 cm, 0.2 mm thick, Merck, Darmstadt, Germany) was done to identify pigments and validate their purification. Thus, crude extract and recovered fraction of fucoxanthin as well as β-carotene underwent a separation by thin layer chromatography.

Five µL of purified fractions were deposited on the silica gel plate. A mobile phase composed of n-hexane:acetone (6:4, v/v) in a saturated glass chamber was used as solvent during 30 min at room temperature. The plate was removed from the tank, dried in regular air and, spots were observed immediately under room light. The Rf values of the photosynthetic pigments chlorophyll, carotenoids and fucoxanthin contained in the crude extract and purified samples were calculated using the standard formula given below.

[Rf = Distance moved by the pigment / Distance moved by the solvent]

Commercialized fucoxanthin (Scientific laboratory supplies) and β-carotene (Sigma-Aldrich) standards were used to identify fucoxanthin and β-carotene, respectively. In parallel, obtained Rf were compared to bibliographic data.

2.2.3. Thin layer chromatography purification of β-carotene

The recovered fraction of β-carotene underwent a second separation by thin layer chromatography. This fraction was eluted with hexane:acetone (8:2, v/v). This eluent was less polar than Hexane:acetone (6:4, v/v). The β-carotene bands were identified by comparison with the migration under the same conditions of standard β-carotene. These bands were scraped off and then dissolved in petroleum ether. After centrifugation, the supernatant also underwent a second migration. The process was repeated until a single band in a silica plate was obtained. The Rf value was calculated using the same formula above.

2.3. HPLC analysis

HPLC was used to confirm the purity of fucoxanthin and β-carotene fractions after column chromatography purification and TLC analysis. The HPLC system includes an LC-20AT pump system, a UV-Vis SPD-20A absorption detector, and online Analysis Software. A Luna 5 M C 18 (4.6 mm 250 mm, 5 µm particle size, Phenomenex, Torrance, CA, USA) reversed-phase column was used for separation. For fucoxanthin elution, pure methanol was used as mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. For β-carotene elution chromatographic separation was performed using gradient elution with a tertiary

mobile phase of MeOH-10 mM ammonium acetate, MTBE (100%), and water (100%) set in reservoirs A, B, and C, respectively. Separations were performed by the following solvent gradient: 0–24 min 83% A, 15% B and 2% C; 24–32 min 63.5% A, 35% B, and 1.5% C; 32–34 min 33.5% A, 66% B, and 0.5% C; and 35 min 83% A, 15% B, and 2% C. The injection volume was set at 20 μL at 28°C and the detection wavelength for the two pigments was adjusted to 450 nm. Before injection, all samples were filtered using a 0.22 μm filter. Pure fucoxanthin and β -carotene standards were dissolved in methanol at concentrations of 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in pure methanol were used as an internal standard [29].

2.4. α -amylase inhibitory activity

Bernfeld's chromogenic technique was used to determine α -amylase inhibitory activity [27,30,31]. Porcine pancreatic amylase was dissolved at 4°C in water to achieve a concentration of 4 U/mL. 0.5% of potato starch (w/v) dissolved in 20 mmol/L of phosphate buffer at pH 6.9 with 6.7 mmol/L of sodium chloride as the substrate. 40 μL of fucoxanthin extract dissolved in DMSO 0.01% (w/v) was mixed with 400 μL of starch solution and 160 μL of distilled water. 200 μL of enzyme solution (4 U/mL) was added at the beginning of the reaction, and the mixture was then incubated for 3 min at 25°C. 200 μL of the previous mixture were transferred to glass tube containing 100 μL DNS solution (96 mmol/L of 3,5-dinitrosalicylic mixed with 5.31 mol/L of sodium potassium tartrate in 2 mol/L NaOH). Then, mixture was incubated at 85°C for 15 min using a water bath before being diluted with 900 μL of distilled water. The absorbance at 540 nm was used to calculate α -amylase activity. The acarbose (A8980-1G, SIGMA) was used as a positive control and was dissolved in distilled water [27,31]. The percentage of α -amylase inhibitory activity was estimated using the following equation (Eq 1):

$$\text{Inhibition (\%)} = ((A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}) \times 100 \quad (1)$$

where A_{control} and A_{sample} are the absorbance of the control and the sample at 540 nm, respectively.

2.5. Trypsin inhibitory activity

The enzymatic activity was measured according to the Kunitz method [32]. Fifty μL of trypsin (2 mg/mL) prepared in Tris-HCL buffer (0.1 M, pH 8) was pre-incubated with 100 μL of fucoxanthin solution (2 mg/mL in DMSO 0.01%) for 30 min. 0.5 mL of a casein solution (1%), prepared in Tris-HCL buffer (0.1 M, pH 8), was added, and the mixture was incubated at 37°C for 30 min. The

reaction was stopped by adding 0.5 mL of trichloroacetic acid (TCA) (0.44 M) [33]. This mixture was centrifuged at 12,000 rpm for 20 min and the absorbance was measured at 280 nm (Equation 2).

$$\text{Inhibition activity (\%)} = ((A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}) \times 100 \quad (2)$$

where A_{control} and A_{sample} are the absorbance of the control and the sample at 280 nm, respectively.

2.6. Antibacterial activity

Three bacteria species, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*, were used in the present study. Luria–Bertani (LB) agar medium was used for the maintenance of bacteria strains [34,35,36]. Minimal inhibitory concentration (MIC) of the fucoxanthin and β -carotene from *H. scoparia* were determined employing microdilution method, using 96-well plates, as described by Chandrasekaran and Venkatesalu [37]. Briefly, microplates, containing serial dilution of purified compounds (fucoxanthin or β -carotene), were inoculated with bacteria cultures aged of 24 h at a final concentration of 10^6 cfu/mL. The minimum inhibitory concentration (MIC) was established as the lowest quantity of substances that inhibits the observed growth of the used microorganisms [37].

3. Results and discussion

3.1. Pigments extraction and quantification

Fucoxanthin and β -carotene were mechanically extracted from dry biomass powder of *H. scoparia* using methanol as solvent. The obtained fucoxanthin yield was 2.0 ± 0.1 mg/g DW. Several macroalgae are known for their ability to produce fucoxanthins. However, their production rates vary depending on the species. For example, fucoxanthins have been reported to be produced by *Cystoseira indica*, *Tisochrysis lutea*, *Pavlova lutheri*, *Sargassum fusiformis*, and *Sphaerotrichia divaricate* with a production rate of about 2.3, 16.05, 20.86, 0.01 and 0.2 mg/g DW, respectively [16,38,39,40]. Fung et al. [29] reported that seaweeds gathered between winter and spring showed to have high fucoxanthin production. In addition, microalgues species produced fucoxanthin such as *Isochrysis galbana*, [41] and their production rates depend on growing conditions.

In the other hand, the extraction yield of β -carotene obtained from *H. scoparia* was about 0.054 ± 0.02 mg/g DW. This obtained yield was considerably higher than the one obtained from *Macrocystis pyrifera*

(0.0174 mg/g DW). While, other microalgae showed significant levels of β -carotene like *Codium fragile* and *Gracilaria chilensis* which produced 0.197 and 0.113 mg/g DW, respectively [42].

The variation in quality and extraction yield of fucoxanthin and β -carotene is affected by different factors such as algal species, growth environmental factors and harvesting season but also by the used solvent as well as well as the extraction procedures and used organic solvents [43].

3.2. Pigments purification

Silica column chromatography was used to purify the extracted pigments using (i) n-hexane as a non-polar solvent to remove neutral lipids and (ii) acetone as a polar solvent to remove phospholipids and glycolipids from the crude extract with 6:4 ratio [44]. First, the chlorophyll pigment (blue-green) was eluted, then carotenoids and fucoxanthin (yellow-orange), and finally chlorophyll c (fluorescent green). The yellow-orange fraction was then analyzed spectroscopically, and the maximum absorbance at 450 nm was used to confirm that fractions contain fucoxanthin. TLC technique was performed to analyze the crude extract as well as the pigment content in the collected fractions using n-hexane and acetone in a 6:4 ratio. The chromatographic profile of the crude extract (Figure 1A), visualized under visible light, indicated the presence of at least 7 different spots colors corresponding to separate pigments from the crude extract where the main colorful pigments in *H. scoparia* have been described as fucoxanthin, β -carotene, chlorophyll and other carotenoids. Hence, the grey indicator was for pheophytin, green-blueish was

chlorophyll a, green was chlorophyll b, while yellow, yellow-orange, and dark orange were carotenoids [45]. Rf values for separated pigments were calculated and compared to conventional Rf values of fucoxanthin and β -carotene standards. The obtained results confirmed the presence of fucoxanthin and β -carotene in the recovered crude pigments. Figure 1B showed the migration of purified fucoxanthin from the crude extract and represents a common orange spot color with the same Rf 0.31 from the crude extract and fucoxanthin standard. Maeda et al. [46] reported that the fucoxanthin was purified from *Undaria pinnatifida* using salicylic acid column chromatography and the same elution gradient n-hexane and acetone (6:4). In addition, [47] proved that the optimum separation of fucoxanthin from the crude extract using TLC occurs when Rf values are between 0.3 and 0.5. In the same way, Rajauria and Abu-Ghannam [48] demonstrated that fucoxanthin extracted from the brown seaweed *Himantalia elongate* has an intense orange color bond after TLC migration at Rf = 0.36.

Concerning β -carotene, previous reports showed that it is less polar than the fucoxanthin pigment and was better solvable in the non-polar solvent Hexane/acetone (8:2) in addition to having less affinity to the silica plate [49]. This finding demonstrated also that β -carotene migrates a larger distance than fucoxanthin and reaches an Rf of 0.9. Figure 2A represented the chromatographic profile of crude extract migration in hexane/acetone (8:2) and showed multiple spots colors with different Rf corresponding to different pigments present in the crude extract. The migration profile of purified β -carotene extract that represents a common

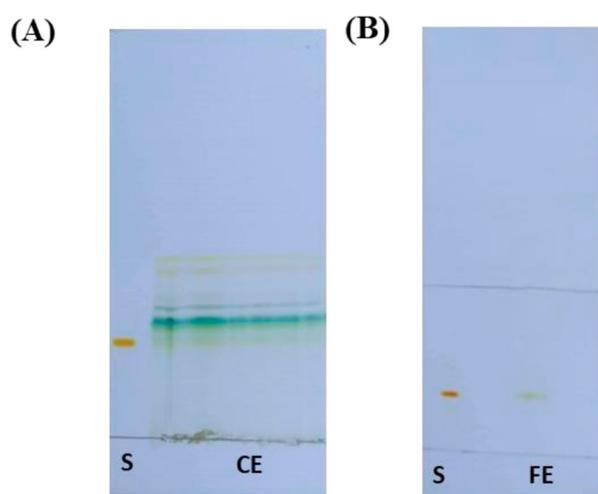


Figure 1. Thin layer chromatography of crude extract from *H. scoparia*. thin layer chromatography migration profile of crude extract (A) and fucoxanthin standard and purified fraction (B). (S: Fucoxanthin standard, CE: crude extract, FE: fucoxanthin extract).

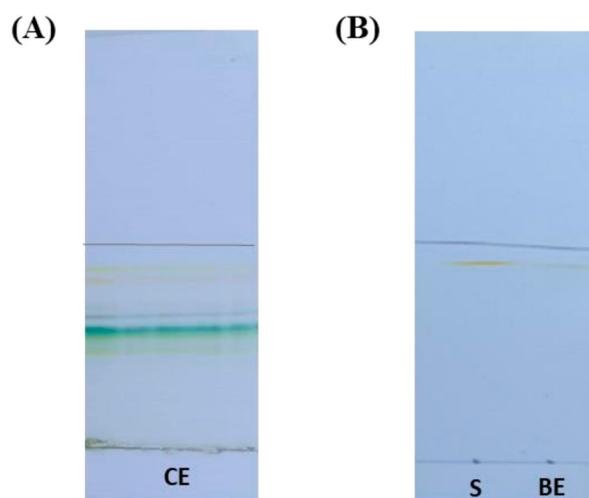


Figure 2. Thin-layer chromatography of crude extract from *H. scoparia*. thin layer chromatography migration profile of crude extract (A) and β -carotene standard and purified fraction (B). (S: β -carotene standard, CE: crude extract, BE: β -carotene extract).

orange spot color with the same Rf 0.9 from the crude extract and β -carotene standard (Figure 2B). The TLC proved that the extracted carotenoid was β -carotene having the same Rf of β -carotene standard and its purity (one and only spot color). This difference between Rf of fucoxanthin and β -carotene is correlated to the chemical structures of those different pigments and their polar (OH) and nonpolar (CH) groups content. Furthermore, many studies reported that carotenes are the least polar pigments (no polar groups), whereas xanthophylls are the most polar [50].

3.3. Identification of fucoxanthin and β -carotene by HPLC

HPLC chromatography was used to check the purity of fucoxanthin and β -carotene after silica gel column chromatography by comparing its UV-visible spectra and retention time (RT) to those of the standards.

Figure 3 showed the presence of one major peak at RT of 7.6 and 7.7 min corresponding to the purified fucoxanthin extract and fucoxanthin standard, respectively. This result was in concordance with previous work done by Jaswir et al. [47] who reported the presence of one major pic of trans-fucoxanthin extracted from *Terrycarlessia turbinata* at 7.8 min after analysis using reversed phase-HPLC. Compared to the standard, the major pics at 7.7 probably corresponding to trans-fucoxanthin isomer but the minor pics at 10.26 min demonstrate the presence of small amount of cis-fucoxanthin isomers (5.6%). Wang et al. [28], by using the same method of extraction and purification, outline that fucoxanthin extracted from *Undaria pinatifida* contained 88% of trans-fucoxanthin and 9% of cis-fucoxanthin. In addition, fucoxanthins obtained from the macroalgae *Saccharina Japonica* and the microalgae *Chaetoceros calcitrans* were similar to those obtained for *H. scoparia* fucoxanthin and showed major pics at 7 min [51].

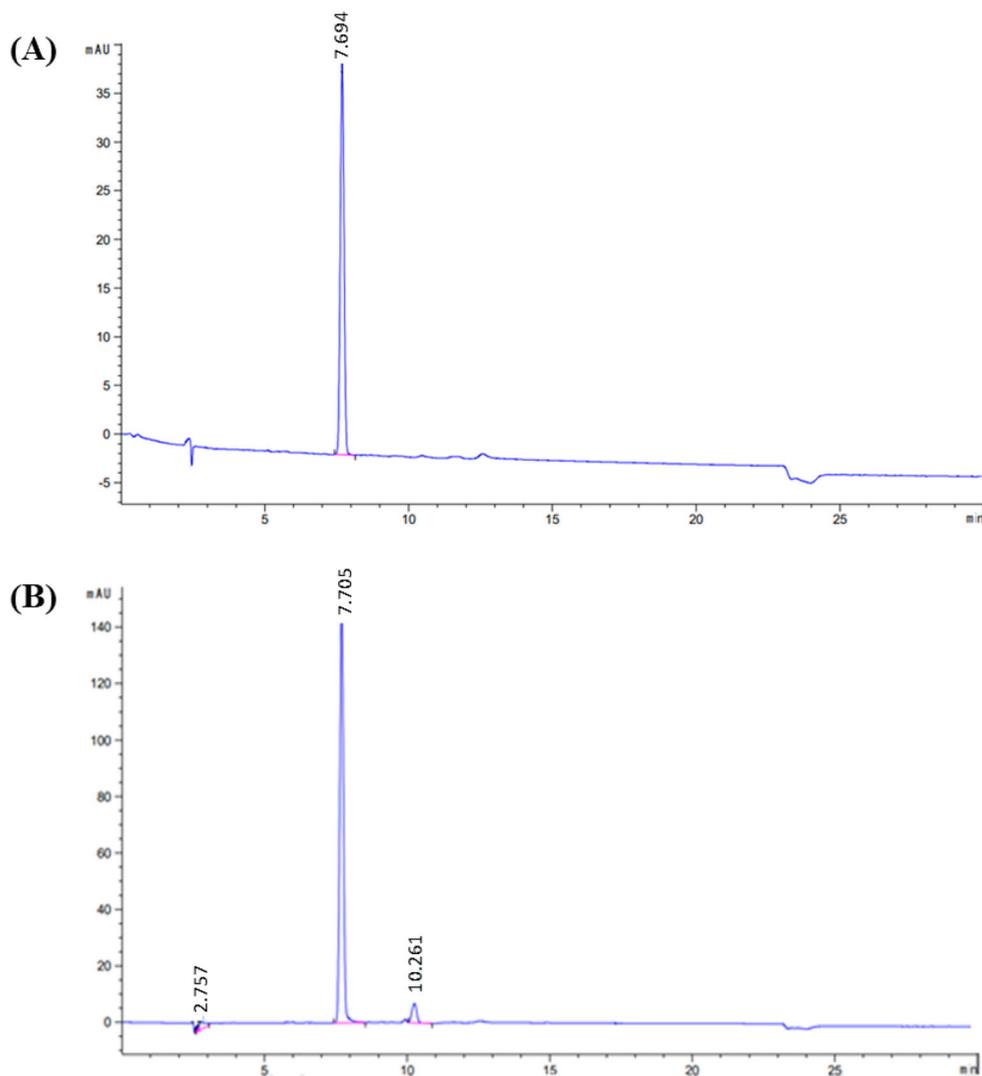


Figure 3. HPLC chromatograms analysis of purified fucoxanthin (A: fucoxanthin standard), (B: fucoxanthin extract from *H. scoparia*) at $\lambda = 450$ nm.

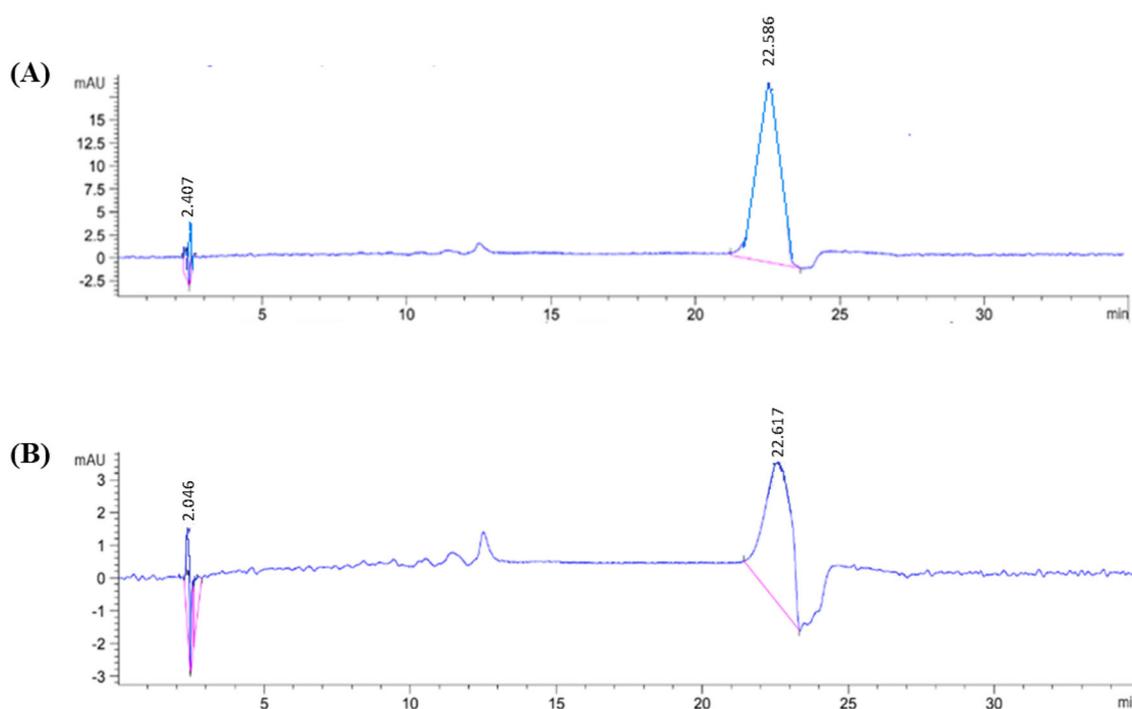


Figure 4. HPLC chromatograms analysis of purified β -carotene (A: β -carotene standard), (B: β -carotene extract from *H. scoparia*) at $\lambda = 450$ nm.

The chromatogram obtained for β -carotene purified fraction from *H. scoparia* crude extract showed major peaks at 22.6 min (Figure 4). This chromatogram was similar to that obtained for β -carotene standard that showed also a major peak at 22.5 min. In concordance, the same elution gradient was used by Gebregziabher et al. [52] for the analysis of β -carotene extracted from *T. turbinata* using HPLC C18 and the obtained retention time was 23 min. Furthermore, the retention time of the β -carotene fraction is influenced by the elution gradient. In fact, Takaichi [53] demonstrated that the fraction of β -carotene extract obtained from biological materials using HPLC C18 presents a peak of β -carotene at 19.5 min using Acetonitrile–methanol– tetrahydrofuran. While, Kraay et al. [54] reported that β -carotene fraction extracted from marine phytoplankton have a retention time of about 26 min using HPLC C18 and a gradient of 0.5 M ammonium acetate in methanol and water (85/15, (v/v)), acetonitrile and water (90/10, (v/v)) and 100% ethyl acetate. This proved that the retention time of the β -carotene fraction was influenced by the elution gradient.

3.4. Antidiabetic activity of the purified compound

3.4.1. Inhibition of α -amylase enzyme

α -amylase is a critical enzyme that contributes to the human carbohydrate digestion system and is able to break down the α -(1,4)-glycosidic linkages of starch,

glycogen, and other polysaccharides and generate oligosaccharides and disaccharides. Thus, inhibiting this enzyme regulates diabetes by reducing glucose production and suppressing hyperglycemia [7]. Furthermore, the majority of brown macroalgae have been shown to contain various α -amylase inhibitors such as *Ascophyllum nodosum*, *Sargassum hemiphyllum*, and *Turbinaria conoides* [55]. The inhibitory effects of both extracted pigments, fucoxanthin and β -carotene were estimated (Figure 5). The obtained results showed that IC_{50} values of fucoxanthin extract was about 300 $\mu\text{g/mL}$ which was similar to the commercialised fucoxanthin. Concerning the purified β -carotene as well as the commercialised β -carotene, the IC_{50} values were close and in order of 500 $\mu\text{g/mL}$. In parallel, α -amylase inhibitory effects of acarbose, a standard α -amylase inhibitor, were evaluated. Both pigments extracted from *H. scoparia* exhibited a significantly inhibition of α -amylase activity in a dose-dependent manner like acarbose [27]. In concordance with the results showed herein, α -amylase inhibitory effect of fucoxanthin extracted from *Sargassum hemiphyllum* was about 350 $\mu\text{g/mL}$ [27,56]. The inhibitory effect of microalgal fucoxanthin toward α -amylase was explained by the formation of hydrogen bonds between OH groups of the pigment and carboxylate groups present in the active site of α -amylase [27]. In the other hand, carrot extracts rich in β -carotene, has the potential to inhibit α -amylase with an IC_{50}

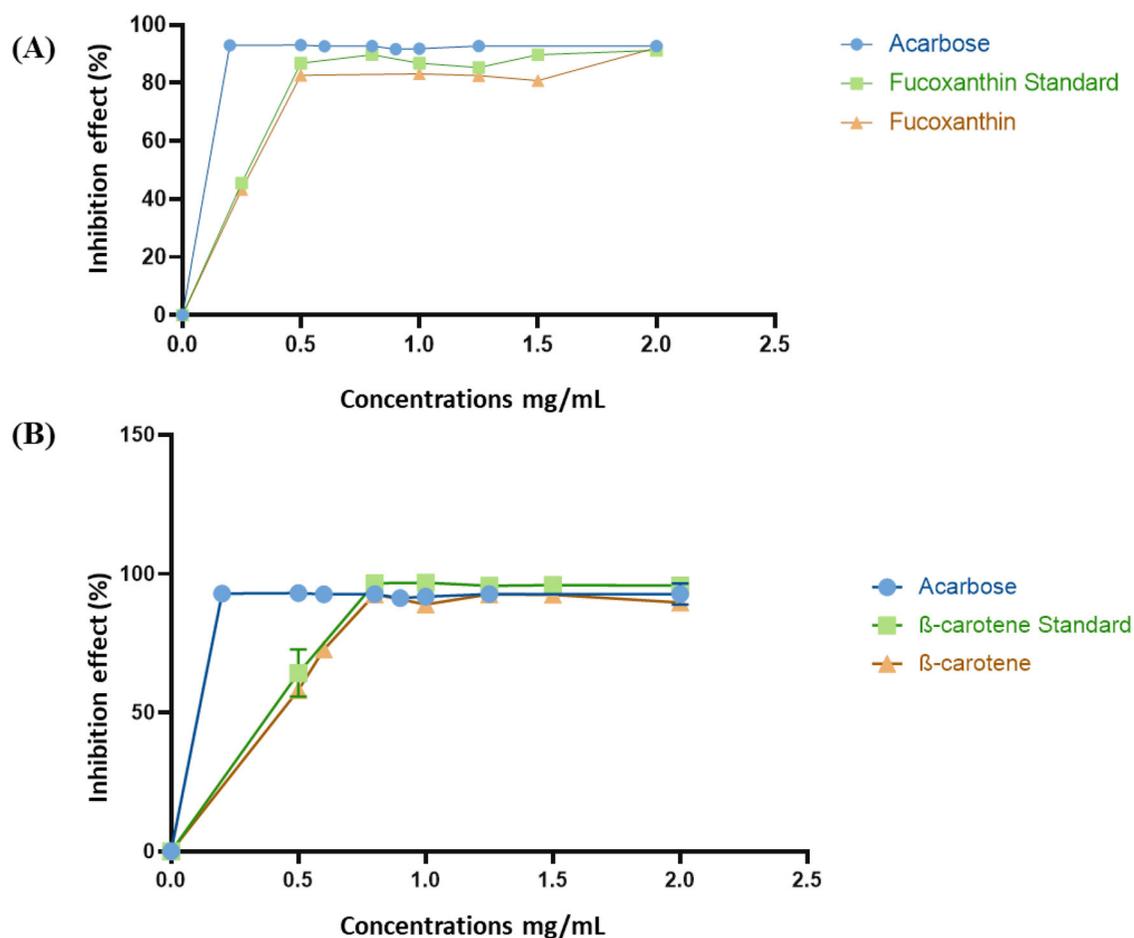


Figure 5. Inhibition effect of α -amylase using purified fucoxanthin (A), β -carotene (B) from *H. scoparia* and acarbose as positive control.

ranging from 107.85 to 807.92 mg/mL [57]. The terpenoids mainly squalene could exhibit α -amylase inhibition effects [58,59].

3.4.2. Inhibition of trypsin enzyme

Trypsin has a direct effect on diabetes through insulin inactivation and increasing concentration of both pancreatic and intestinal amylase. Thus, many studies reported that oral trypsin inhibitor administration was a therapy that lowered blood glucose secretion and enhanced insulin resistance [22]. Thus, investigations of the inhibitory effect of *H. scoparia* fucoxanthin and β -carotene extracts were made (Figure 6). The obtained results showed a slight difference between the IC_{50} values of the purified fucoxanthin and commercialised fucoxanthin standards that were 800 and 850 μ g/mL, respectively. Similar values of IC_{50} between 800 and 900 μ g/mL were found the purified β -carotene and β -carotene standard. The observed inhibitory effects could be explained by the disturbance in trypsin conformation due to its interaction with *H. scoparia* purified pigments. In fact, Wang et al. [28] reported that bisphenol which is an organic

composite containing hydroxyl groups can affect the secondary and the tertiary structure of trypsin. In addition, Cudina and Jovanović [60] confirmed that hydroxyl groups may react with the trypsin and cause its inactivation.

3.5. Antibacterial activity

The extracted fucoxanthin and β -carotene were tested for their antibacterial potential. Hence, three pathogenic bacteria responsible for gastro-intestinal infections were used. The obtained results showed that the MIC of the purified fucoxanthin against *L. monocytogenes* was 1.25 ± 0.05 mg/mL. Rajauria and Abu-Ghannam [48] reported that the antimicrobial activity of purified fucoxanthin from *Himanthalia elongate* against *L. monocytogenes* was 1 mg/mL. It has been reported that fucoxanthin has an important antibacterial activity mainly against aerobic bacteria at concentrations ranging from 10 to 250 μ g/mL, while, weak activities against anaerobic bacteria using doses greater than 1000 μ g/mL [48]. According to literature, natural

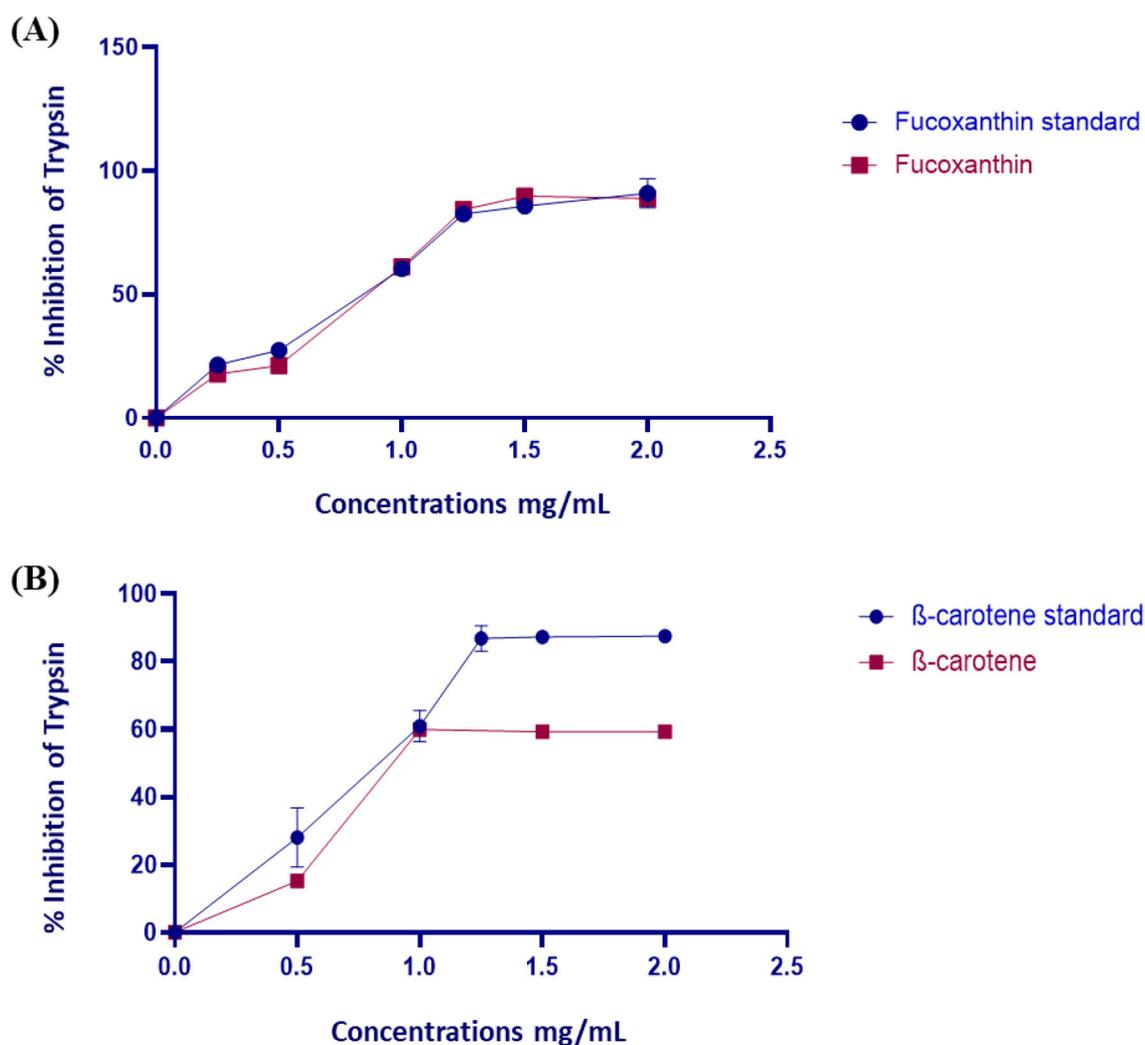


Figure 6. Inhibition effect of trypsin using purified fucoxanthin (A) and β -carotene (B).

compounds which have MIC above 1000 $\mu\text{g/mL}$ were considered to have poor antibacterial activity [61,62].

The purified β -carotene showed a MIC of 0.225 ± 0.05 , 0.1125 ± 0.018 , and 0.225 ± 0.01 mg/mL against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, and *S. enterica*, respectively. This study revealed the greatest antimicrobial activity of β -carotene extracted from *H. scoparia*. Abdulhadi et al. [63] reported that the β -carotene isolated from fruiting bodies of *Suillus* sp. has a remarkable antibacterial activity against *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, and *S. aureus* with MIC around 100 mg/mL. These results support the fact that β -carotene is considered an antibacterial agent which can be used in therapeutic applications.

5. Conclusions

The current study revealed the significant anti-diabetic impact of carotenoids extracted from the Tunisian brown seaweed *H. scoparia*. Fucoxanthin and β -carotene

have inhibitor effects against α -amylase and trypsin which suggests the protection properties of both purified pigments against diabetes by reducing blood glucose and their therapeutic efficiency, especially in type 2 diabetics. This study confirms that β -carotene has more effective antibacterial activity against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, and *S. enterica* than fucoxanthin extract. In addition, these results highlight the importance of the exploration of marine organisms which constitutes a promising source of functional and beneficial natural compounds not only for human diabetes but also for their medical functions such as anticancer and anti-inflammatory properties. Thus, fucoxanthin demonstrate its potential growing market due to their increasing demand. Overall, this work contributes to the current investigations of Tunisian biotope by the exploration of local brown macroalgae by extracting their pigments, especially their fucoxanthin content at a low cost in comparison to the price of fucoxanthin standard. It was a new economic

solution to gain 1/3 of its cost in comparison to the standard fucoxanthin price (€70.20 per kg).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was funded by the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. Access to some data may be restricted due to privacy concerns.

References

- [1] Mannan A, Rupa BA, Azam NK, et al. A quick review on anti-diabetic plants and action of phytochemicals. *Int J Adv Res.* 2014;2:227.
- [2] Abuyassin B, Laher I. Diabetes epidemic sweeping the Arab world. *World J Diabetes.* 2016;7:165–174. doi:10.4239/wjd.v7.i8.165.
- [3] Abu-Odeh AM, Talib WH. Middle East medicinal plants in the treatment of diabetes: a review. *Molecules.* 2021;26:742. doi:10.3390/molecules26030742.
- [4] Cherif I, Rejaibi S, Mansour NB, et al. Oral presentations: diabetes control and stroke care. *Eur J Public Health.* 2021;3:125–126.
- [5] Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol.* 2005;99:325–348. doi:10.1016/j.jep.2005.04.019.
- [6] Sathasivampillai SV, Rajamanoharan PRS, Munday M, et al. Plants used to treat diabetes in Sri Lankan siddha medicine, an ethnopharmacological review of historical and modern sources. *J Ethnopharmacol.* 2017;198:531–599. doi:10.1016/j.jep.2016.07.053.
- [7] Gunathilaka TL, Samarakoon K, Ranasinghe P, et al. Antidiabetic potential of marine brown algae - a mini review. *J Diabetes Res.* 2020;2020:1230218. doi:10.1155/2020/1230218.
- [8] Lee SH, Jeon YJ. Anti-diabetic effects of brown algae-derived phlorotannins, marine polyphenols through diverse mechanisms. *Fitoterapia.* 2013;86:129–136. doi:10.1016/j.fitote.2013.02.013.
- [9] Chauhan A, Sharma P, Srivastava P, et al. Plants having potential antidiabetic activity: A review. *Der. Pharm. Lett.* 2010;2:369–387.
- [10] Bhushan MS, Rao CHV, Ojha SK, et al. An analytical review of plants for anti-diabetic activity with their phytoconstituent & mechanism of action. *Int J Pharm Sci Res.* 2010;1:29–46.
- [11] Afonso NC, Catarino MD, Silva AMS, et al. Brown macroalgae as valuable food ingredients. *Antioxidants.* 2019;8:365. doi:10.3390/antiox8090365.
- [12] Novoveská L, Ross ME, Stanley MS, et al. Microalgal carotenoids: a review of production, current markets, regulations, and future direction. *Mar Drugs.* 2019;17:640. doi:10.3390/md17110640.
- [13] Marcelino G, Machate DJ, Freitas K, et al. β -Carotene: preventive role for type 2 diabetes mellitus and obesity: a review. *Molecules.* 2020;25:5803. doi:10.3390/molecules25245803.
- [14] Bae M, Kim MB, Park Y-K, et al. Health benefits of fucoxanthin in the prevention of chronic diseases. *BBA Mol Cell Bio Lipids.* 2020;11:1865. doi:10.1016/j.bbalip.2020.158618.
- [15] Khaw YS, Yusoff FM, Tan HT, et al. The critical studies of fucoxanthin research trends from 1928 to June 2021: a bibliometric review. *Mar Drugs.* 2021;19:606. doi:10.3390/md19110606.
- [16] Leong YK, Chen CY, Varjani S, et al. Producing fucoxanthin from algae—recent advances in cultivation strategies and downstream processing. *Bioresour Technol.* 2022;344:126170. doi:10.1016/j.biortech.2021.126170.
- [17] Xiao H, Zhao J, Fang C, et al. Advances in studies on the pharmacological activities of fucoxanthin. *Mar Drugs.* 2020;18:634. doi:10.3390/md18120634.
- [18] Bogacz-Radomska L, Harasym J., β -Carotene properties and production methods. *Food Qual Saf.* 2018;2:69–74. doi:10.1093/fqsafe/fyy004.
- [19] Johra FT, Bepari AK, Bristy AT, et al. A mechanistic review of β -carotene, lutein, and zeaxanthin in eye health and disease. *Antioxidants.* 2020;9:1046. doi:10.3390/antiox9111046.
- [20] Lourenço-Lopes C, Fraga-Corral M, Jimenez-Lopez C, et al. Biological action mechanisms of fucoxanthin extracted from algae for application in food and cosmetic industries. *Trends Food Sci Technol.* 2021;117:163–181. doi:10.1016/j.tifs.2021.03.012.
- [21] Cristina Oliveira de Lima V, Piuvezam G, Leal Lima Maciel B, et al. Trypsin inhibitors: promising candidate satietogenic proteins as complementary treatment for obesity and metabolic disorders. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2019;34:405–419. doi:10.1080/14756366.2018.1542387.
- [22] Ihse I, Lundquist I, Arnesjö B. Oral trypsin-inhibitor-induced improvement of the exocrine and endocrine pancreatic functions in alloxan diabetic rats. *Scand J Gastroenterol.* 1976;11:363–368. doi:10.1080/00365521.1976.12097119.
- [23] Karpiński TM, Ożarowski M, Alam R, et al. What do we know about antimicrobial activity of astaxanthin and fucoxanthin. *Mar Drugs.* 2021;20:36. doi:10.3390/md20010036.
- [24] Gutiérrez-Del-Río I, Fernández J, Lombó F. Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;52:309–315. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.04.024.
- [25] Seukep AJ, Kuete V, Nahar L, et al. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. *J Pharm Anal.* 2020;10:277–290. doi:10.1016/j.jpha.2019.11.002.
- [26] Hentati F, Delattre C, Gardarin C, et al. Structural features and rheological properties of a sulfated xylogalactan-rich fraction isolated from Tunisian red seaweed *Jania adhaerens*. *Appl Sci.* 2020;10:1655. doi:10.3390/app10051655.

- [27] Kawee-Ai A, Kim AT, Kim SM. Inhibitory activities of microalgal fucoxanthin against α -amylase, α -glucosidase, and glucose oxidase in 3T3-L1 cells linked to type 2 diabetes. *J Oceanol Limnol.* 2019;37:928–937. doi:10.1007/s00343-019-8098-9.
- [28] Wang S, Wei X, Zhou J, et al. Identification of α 2 macroglobulin (A2M) as a master inhibitor of cartilage degrading factors that attenuates the progression of post-traumatic osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:1843–1853. doi:10.1002/art.38576.
- [29] Fung A, Hamid N, Lu J. Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chem.* 2013;136:1055–1062. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.024.
- [30] Bernfeld P. Amylases, α and β . In: *Methods in enzymology* (Vol. 1). Elsevier; (1955). p. 149–158. doi:10.1016/0076-6879(55)01021-5.
- [31] Choudhary DK, Mishra A. *In vitro* and *in silico* interaction of porcine α -amylase with *Vicia faba* crude seed extract and evaluation of antidiabetic activity. *Bioengineered.* 2017;8:393–403. doi:10.1080/21655979.2016.1235102.
- [32] Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. *J Gen Physiol.* 1947;30:291–310. doi:10.1085/jgp.30.4.291.
- [33] Elleuch J, HadjKacem F, Ben Amor F, et al. Extracellular neutral protease from *Arthrospira platensis*: production, optimization and partial characterization. *Int J Bio Macromol.* 2021;167:1491–1498. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.102.
- [34] Abdelkafi S, Chamkha M, Casalot L, et al. Isolation and characterization of a novel *Bacillus* sp., strain YAS1, capable of transforming tyrosol under hypersaline conditions. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;252:79–84. doi:10.1016/j.femsle.2005.08.032.
- [35] Elleuch J, Zghal RZ, Ben Fguira I, et al. Effects of the P20 protein from *Bacillus thuringiensis israelensis* on insecticidal crystal protein Cry4Ba. *Int J Bio Macromol.* 2015;79:174–179. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.04.035.
- [36] Abdelkafi S, Labat M, Ben Ali Gam Z, et al. Optimized conditions for the synthesis of vanillic acid under hypersaline conditions by *Halomonas elongata* DSM 2581 T resting cells. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008;24:675–680. doi:10.1007/s11274-007-9523-3.
- [37] Chandrasekaran M, Venkatesalu V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *J Ethnopharmacol.* 2004;91:105–108. doi:10.1016/j.jep.2003.12.012.
- [38] Jaswir I, Noviendri D, Salleh HM, et al. Fucoxanthin extractions of brown seaweeds and analysis of their lipid fraction in methanol. *Food Sci Technol Res.* 2012;18:251–257. doi:10.3136/fstr.18.251.
- [39] Méresse S, Fodil M, Fleury F, et al. Fucoxanthin, a marine-derived carotenoid from brown seaweeds and microalgae: a promising bioactive compound for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2020;21:9273. doi:10.3390/ijms21239273.
- [40] Pajot A, Hao Huynh G, Picot L, et al. Fucoxanthin from algae to human, an extraordinary bioresource: insights and advances in up and downstream processes. *Mar Drugs.* 2022;20:222. doi:10.3390/md20040222.
- [41] Perez E, Ruiz-Dominguez MC, Morales Espinoza J, et al. Fucoxanthin from marine microalgae *Isochrysis galbana*: optimization of extraction methods with organic solvents. *Dyna.* 2019;86:174–178. doi:10.15446/dyna.v86n210.72932.
- [42] Ortiz J, Uquiche E, Robert P, et al. Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2009;111:320–327. doi:10.1002/ejlt.200800140.
- [43] Qiu S, Shen Y, Wu Z, et al. Effects of algae subtype and extraction condition on extracted fucoxanthin antioxidant property: a 20-year meta-analysis. *Algal Res.* 2021;53:102161. doi:10.1016/j.algal.2020.102161.
- [44] Sun P, Wong CC, Li Y, et al. A novel strategy for isolation and purification of fucoxanthinol and fucoxanthin from the diatom *Nitzschia laevis*. *Food Chem.* 2019;277:566–572. doi:10.1016/j.foodchem.2018.10.133.
- [45] Kusmita L, Puspitaningrum I, Limantara L. Identification, isolation and antioxidant activity of pheophytin from green tea (*Camellia Sinensis* (L.) Kuntze). *Procedia Chem.* 2015;14:232–238. doi:10.1016/j.proche.2015.03.033.
- [46] Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, et al. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;332:392–397. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.002.
- [47] Jaswir I, Noviendri D, Salleh HM, et al. Analysis of fucoxanthin content and purification of all-trans-fucoxanthin from *Turbinaria turbinata* and *Sargassum plagyophyllum* by SiO₂ open column chromatography and reversed phase-hplc. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2013;36:1340–1354. doi:10.1080/10826076.2012.691435.
- [48] Rajauria G, Abu-Ghannam N. Isolation and partial characterization of bioactive fucoxanthin from *Himanthalia elongata* brown seaweed: A TLC-based approach. *Int J Anal Chem.* 2013; 802573. doi:10.1155/2013/802573.
- [49] Ambarwati NSS, Armandari MO, Widayat W, et al. *In vitro* studies on the cytotoxicity, elastase, and tyrosinase inhibitory activities of tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) extract. *J Adv Pharm Technol Res.* 2022;13:182–186. doi:10.4103/japtr.japtr_49_22.
- [50] Liae-Jensen S, Jensen A. Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. In: *Methods in enzymology* (Vol. 23). Elsevier; (1971). p. 586–602. doi:10.1016/S0076-6879(71)23132-3.
- [51] Foo SC, Yusoff FM, Ismail M, et al. HPLC fucoxanthin profiles of a microalgae, a macroalgae and a pure fucoxanthin standard. *Data Brief.* 2017;10:583–586. doi:10.1016/j.dib.2016.12.047.
- [52] Gebregziabher BS, Zhang S, Qi J, et al. Simultaneous determination of carotenoids and chlorophylls by the HPLC-UV-VIS method in soybean seeds. *Agron J.* 2021;11:758. doi:10.3390/agronomy11040758.
- [53] Takaichi S. Characterization of carotenes in a combination of a C18 HPLC column with isocratic elution and absorption spectra with a photodiode-array detector. *Photosynth Res.* 2000;65:93–99. doi:10.1023/A:1006445503030.
- [54] Kraay GW, Zapata M, Veldhuis MJW. Separation of chlorophylls c1c2, and c3 of marine phytoplankton by reversed-phase-c18-high-performance liquid chromatography1. *J Phycol.* 1992;28:708–712. doi:10.1111/j.0022-3646.1992.00708.x.

- [55] Sharifuddin Y, Chin YX, Lim PE, et al. Potential bioactive compounds from seaweed for diabetes management. *Mar Drugs*. 2015;13:5447–5491. doi:10.3390/md13085447.
- [56] Hwang PA, Hung YL, Tsai YK, et al. The brown seaweed *Sargassum hemiphyllum* exhibits α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity and enhances insulin release *in vitro*. *Cytotechnology*. 2015;67:653–660. doi:10.1007/s10616-014-9745-9.
- [57] Yusuf E, Wojdyło A, Oszmiański J, et al. Nutritional, phytochemical characteristics and *in vitro* effect on α -amylase, α -glucosidase, lipase, and cholinesterase activities of 12 coloured carrot varieties. *Foods*. 2021;10:808. doi:10.3390/foods10040808.
- [58] Conforti F, Statti G, Loizzo MR, et al. *In vitro* antioxidant effect and inhibition of alpha-amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds. *Bio Pharm Bull*. 2005;28:1098–1102. doi:10.1248/bpb.28.1098.
- [59] Sales PM, Souza PM, Simeoni LA, et al. α -Amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. *J Pharm Pharm Sci*. 2012;15:141–183. doi:10.18433/j35s3k.
- [60] Cudina I, Jovanović SV. Free radical inactivation of trypsin. *Int J Radiat Part C Radiat; Phys Chem*. 1988;32:497–501. doi:10.1016/1359-0197(88)90055-0.
- [61] Abou-Dobara MADMI. Antibacterial activity of some marine algal extracts against most nosocomial bacterial infections. *Egypt J Bot*. 2013;9:281–286.
- [62] Karpiński TM, Adamczak A. Fucoxanthin-an antibacterial carotenoid. *Antioxidants*. 2019;8:E239. doi:10.3390/antiox8080239.
- [63] Abdulhadi S, Gergees R, Hasan G. Molecular identification, antioxidant efficacy of phenolic compounds, and antimicrobial activity of β -carotene isolated from fruiting bodies of *Suillus* sp. *Karbala J Mod Sci*. 2020;6. doi:10.33640/2405-609X.1966.

CHAPITRE 3 :

Bioconversion de l'algue brune Tunisienne *H. scoparia* :

Application à l'énergie

ARTICLE 3 :

Farah Hadjkacem^{1,2}, Guillaume Pierre^{2,*}, Gwendoline Christophe², Jihen Elleuch¹, Imen Fendri³, Zakaria Boual⁴, Mohamed Didi Ould El Hadj⁴, Zainab El Alaoui-Talibi⁵, Cherkaoui El Modafar⁵, Pascal Dubessay², Cédric Delattre^{2,6}, Philippe Michaud² and Slim Abdelkafi^{1,*} (2022). Bioconversion de l'algue brune Tunisienne *Halopteris scoparia* : Application à l'énergie.

Divers problèmes liés à l'exploitation des énergies fossiles ont ravivé aujourd'hui l'intérêt et encouragé le développement de nouvelles technologies pour la production d'une énergie propre (Morand et al., 1991 ; Park et al., 2009). Les biocarburants de première génération ont été fabriqués à partir des matières premières végétales comme le maïs, le soja, la canne à sucre et le colza. L'utilisation de ces ressources pour la production d'énergie a été diminuée à la vue de l'augmentation des coûts de la production de la biomasse végétale (sans compter la compétition pour des terres agricoles destinées à l'alimentation humaine). La deuxième génération de biocarburants issus de déchets organiques comme matières premières contenant de la lignocellulose a présenté un intérêt grandissant durant cette dernière décennie. Cependant, le principal problème qui limite leur utilisation est la forte résistance de la lignocellulose à la dégradation et donc en sa conversion en biocarburants. De ce fait, la production de biocarburants de la deuxième génération manque toujours de viabilité économique à grande échelle (Smyth et al., 2010). La matière première utilisée pour la génération des biocarburants de troisième génération est représentée par les micro- et les macroalgues, qui possèdent quelques avantages supplémentaires par rapport aux deux générations précédentes. Les algues marines ont des taux de fixation du dioxyde de carbone plus élevés associés à un grand potentiel d'élimination du dioxyde de carbone, ce qui par voie de conséquence amène à des rendements de production d'algues plus élevés par unité de surface que des plantes supérieures terrestres (Cassani et al., 2022). Les micro- et tout particulièrement les macroalgues ne nécessitent pas de terres arables et peuvent être cultivées dans divers environnements, y compris des eaux usées (Tedesco et al., 2014 ; Faisal et al., 2022). La production de biocarburant à partir des macroalgues se caractérisent par un rendement relativement élevé (Chisti et al., 2007). Il a été prouvé que les macroalgues ont un potentiel de production de vecteurs énergétiques pouvant atteindre 2 à 20 fois le potentiel énergétique produit à partir de cultures de plantes terrestres (Bruhn et al., 2011). En effet, les macroalgues ont une capacité photosynthétique plus élevée que les plantes terrestres, ainsi que des teneurs élevées en eau et en glucides plus importantes (Dammer et al., 2017 ; Aresta et al., 2005 ; Levine et al., 2010 ; Chen et al., 2015). Des facteurs tels que la productivité, la facilité de culture, de récolte, le développement et la croissance des macroalgues sont également des considérations majeures pour choisir une algue spécifique (brute et/ou sous-produits de la transformation des algues) mais aussi évaluer son potentiel réelle (industriel et économique) comme matière première pour la production de biocarburants (Dammer et al., 2017 ; Aresta et al., 2005 ; Levine et al., 2010). Selon Chen et al. (2015), les macroalgues peuvent produire une énergie nette de 11 000 MJ/t par un processus de gazéification d'algues sèches, contre 9 500 MJ/t issus de la gazéification des microalgues

(Konda et al., 2015). Les macroalgues brunes contiennent des quantités importantes de sucres fermentescibles (laminarine, fucoïdane, alginate, glucane, etc.) et sont caractérisées par l'absence de lignine. Elles peuvent donc être utilisées dans des technologies de bioraffinerie pour produire du biométhane, du bio-éthanol, du bio-diesel et/ou des bio-huiles (Konda et al., 2015 ; Chen et al., 2015). Plusieurs études ont montré que les macroalgues rouges, vertes et surtout brunes, soumises à une fermentation en anaérobiose à l'aide de différentes souches telles que *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia angophorae*, pouvaient permettre, avec de bons rendements de conversion, une production significative de bio-éthanol. En effet, Cho et al. (2013) ont obtenu un rendement en bio-éthanol de 9,42 g/L à partir d'*U. pinatifida* en utilisant *Pichia angophorae* comme organisme de fermentation alors qu'un rendement de 5,57 g/L a été obtenu après fermentation de *A. nodosum* par *S. cerevisiae*. Il a également été possible d'atteindre, à partir de la macroalgue rouge *Gelidium amansi*, un rendement en bio-éthanol de 20,5 g/L suite à sa fermentation par *Pichia* et un rendement de l'ordre de (3,78 g/L) par *S. cerevisiae* (Kim et al., 2015). En outre, les études réalisées par Meinita et al. (2012) sur *Gracilaria* sp. afin de produire du bio-éthanol ont montré une production de 0,236 g de bio-éthanol par g de macroalgues sèches, ce qui correspond à 81% du rendement théorique de Gay Lussac.

En 2009, la biomasse algale accumulée sur certaines côtes de la Tunisie a été estimée à 394,855 g/m², expliquant la mauvaise qualité de la mer (Karray et al., 2017). L'accumulation de sources azotées et phosphatées, sur certaines côtes tunisiennes, générées par des activités industrielles (e.g. à Sfax), favorise la croissance de certaines macroalgues inusitées au niveau du littoral.

La pollution des côtes tunisiennes par les macroalgues, leur abondance et l'absence de filières industrielles pour leur exploitation vers le secteur de l'énergie nous a incité à évaluer, à travers une preuve de concept, la possibilité de produire différents vecteurs énergétiques (bio-éthanol, H₂ et acides gras volatils) à partir d'*H. scoparia* et de certains des sous-produits générés lors de l'extraction de molécules à plus hautes valeurs ajoutées (polysaccharides, pigments, voir Chapitres 1 et 2).

Une caractérisation biochimique d'*H. scoparia* a permis de mettre en évidence son potentiel de bioconversion en tant que matière brute (fraction RHS). *H. scoparia* ainsi que des co-produits récupérés après l'extraction des hydrocolloïdes (fraction BP1-PS) et des pigments (fraction BP2-F) ont été utilisés comme substrats et soumis à (i) une fermentation anaérobique par *S. cerevisiae* pour produire du bio-éthanol, (ii) une fermentation sombre en utilisant un consortium bactérien issu des zones d'installations et de traitement des eaux usées pour générer

du biohydrogène et des acides gras volatils tels que l'acétate, le butyrate et le propionate. En utilisant la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica*, la biomasse d'*H. scoparia* et les sous-produits d'extraction ont également été utilisés pour produire des lipides par fermentation en anaérobiose. Les lipides ont ensuite été extraits et transestérifiés en esters méthyliques d'acides gras (EMAG), et leurs profils ont été analysés par CPG, afin d'évaluer leurs quantité, qualité et le potentiel pour la filière bio-diesel.

Sans pré-traitement spécifique, la biomasse d'*H. scoparia* ainsi que plusieurs sous-produits, ont été utilisés pour produire de l'éthanol (0,35 g/g MS), dans des rendements comparables au rendement théorique de Gay-Lussac, du H₂ (1,3 mL H₂/g MS), des AGV (612 mg butyrate/L, 225 mg acétate/L, 11 mg propionate/ L) ainsi qu'une petite quantité de lipides (30,5 g/L) (Hadjkacem et al., 2022).

Globalement, ce travail représente **une preuve de concept favorable** à l'utilisation d'*H. scoparia* comme alternative de production d'énergies propres, conditionnée au développement de nouvelles filières de transformation d'algues brunes en Tunisie. Notons que l'utilisation des sous-produits peut réduire les impacts environnementaux et augmenter les bilans et rendements de production comme l'a suggéré notre étude.

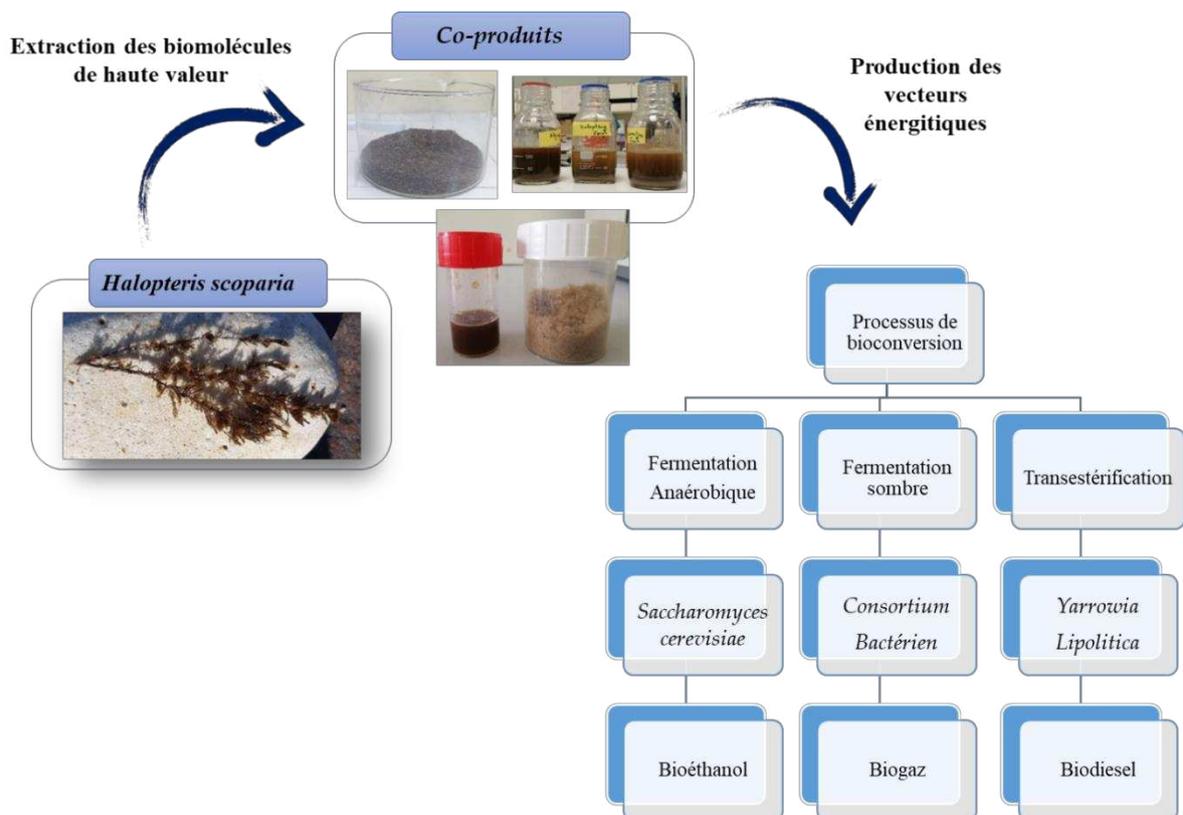
ARTICLE 3

Bioconversion of the Brown Tunisian Seaweed *Halopteris scoparia* : Application to Energy

Farah Hadjkacem^{1,2}, Guillaume Pierre^{2,*}, Gwendoline Christophe², Jihen Elleuch¹,
Imen Fendri³, Zakaria Boual⁴, Mohamed Didi Ould El Hadj⁴, Zainab El Alaoui-Talibi⁵,
Cherkaoui El Modafar⁵, Pascal Dubessay², Cédric Delattre^{2,6}, Philippe Michaud² and
Slim Abdelkafi¹

Energies MDPI (2022)

*IF*₂₀₂₂ = 3,252



Article

Bioconversion of the Brown Tunisian Seaweed *Halopteris scoparia*: Application to Energy

Farah Hadjkacem ^{1,2}, Guillaume Pierre ^{2,*}, Gwendoline Christophe ², Jihen Elleuch ¹, Imen Fendri ³, Zakaria Boual ⁴, Mohamed Didi Ould El Hadj ⁴, Zainab El Alaoui-Talibi ⁵, Cherkaoui El Modafar ⁵, Pascal Dubessay ², Cédric Delattre ^{2,6}, Philippe Michaud ² and Slim Abdelkafi ^{1,*}

- ¹ Laboratoire de Génie Enzymatique et Microbiologique, Equipe de Biotechnologie des Algues, Ecole Nationale d'Ingénieur de Sfax, Sfax 3038, Tunisia; hadjkacemfarah@gmail.com (F.H.); jihen.elleuch@enis.tn (J.E.)
 - ² Institut Pascal, Université Clermont Auvergne, CNRS, Clermont Auvergne INP, F-63000 Clermont-Ferrand, France; gwendoline.christophe@uca.fr (G.C.); pascal.dubessay@uca.fr (P.D.); cedric.delattre@uca.fr (C.D.); philippe.michaud@uca.fr (P.M.)
 - ³ Laboratory of Plant Biotechnologies Applied to the Improvement of Plants, Faculty of Sciences, University of Sfax, Sfax 3038, Tunisia; imen.fendri@fss.usf.tn
 - ⁴ Laboratory for the Protection of Ecosystems in Arid and Semi-Arid Zones, Kasdi Merbah-University, Ouargla 30000, Algeria; biozakaria1983@gmail.com (Z.B.); mohameddidi@yahoo.fr (M.D.O.E.H.)
 - ⁵ Centre d'Agrobiotechnologie et Bioingénierie, Unité de Recherche Labellisée CNRST (Centre AgroBiotech-URL-CNRST-05), Faculté des Sciences et Techniques Marrakech, Université Cadi Ayyad, Marrakech 40000, Morocco; zainab.elalaouitalibi@gmail.com (Z.E.A.-T.); elmodafar@uca.ac.ma (C.E.M.)
 - ⁶ Institut Universitaire de France (IUF), 1 Rue Descartes, F-75005 Paris, France
- * Correspondence: guillaume.pierre@uca.fr (G.P.); slim.abdelkafi@enis.tn (S.A.); Tel.: +33-473-407-422 (G.P.); +216-97-458-923 (S.A.)



Citation: Hadjkacem, F.; Pierre, G.; Christophe, G.; Elleuch, J.; Fendri, I.; Boual, Z.; Ould El Hadj, M.D.; El Alaoui-Talibi, Z.; El Modafar, C.; Dubessay, P.; et al. Bioconversion of the Brown Tunisian Seaweed *Halopteris scoparia*: Application to Energy. *Energies* **2022**, *15*, 4342. <https://doi.org/10.3390/en15124342>

Academic Editors: Shivom Sharma and Gade Pandu Rangaiah

Received: 30 March 2022

Accepted: 11 June 2022

Published: 14 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The brown Tunisian seaweed *Halopteris scoparia* was used as a feedstock for producing renewable bioethanol, biogas, and biodiesel to demonstrate the proof of concept for the North African energy sector. A quantitative and qualitative quantification of *H. scoparia* composition using different colorimetric methods was completed to highlight its bioconversion potential. These substrate inputs were subjected to anaerobic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* to produce bioethanol. The materials were also used to generate bio-hydrogen and volatile fatty acids during dark fermentation by a bacterial consortium and using the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. The lipids were extracted and trans-esterified to Fatty Acid Methyl Esters (FAMES), and their profiles were then analyzed with gas chromatography (GC). A significant ratio of the bioethanol, e.g., 0.35 g ethanol/g DW substrate, was produced without pretreatment, consistent with the theoretical Gay-Lussac yield. The production of the biohydrogen and lipids were up to 1.3 mL H₂/g DW substrate and 0.04 g/g DW substrate, respectively, from the raw biomass. These results were higher than those reported for other well-studied seaweeds such as *L. japonica*. Overall, this work contributes to the current investigations in Tunisia for producing alternative energies from algae and finding new solutions to the current energy situation and environmental challenges in Maghreb.

Keywords: *Halopteris scoparia*; by-product; ethanol; bio-hydrogen; lipid; fermentation

1. Introduction

Macroalgae, commonly referred to as seaweed, are multicellular, macroscopic, eukaryotic, and autotrophic organisms divided into three categories depending on their thallus pigmentations (green, red, and brown), which can be harvested from natural resources but also cultivated [1,2]. Owing to their richness in organic compounds and their ability to generate bioactive primary and secondary metabolites (e.g., pigments, fatty acids, proteins, polyphenols, enzymes, and carbohydrates), seaweeds are beneficial resources widely studied over the past decade [3].

Until recently, several nations have shown a significant interest in the usage and the exploitation of macroalgae for a variety of reasons, such as the production of polysaccharides, which can possess interesting properties for polymers (biocompatibility, non-toxicity, and biodegradability), de facto contributing to their high economic worth, especially in a strong sustainable development context [4]. This is the case for the sulfated polysaccharides, alginate, and laminarin extracted from brown macroalgae, despite their low mass content (up to 5% *w/w*) [5–7]. Other active molecules can be extracted from seaweeds, for instance phenolic compounds, which can show significant anti-inflammatory or anti-proliferative characteristics [8]. The macroalgae extracts have many other reported benefits, such as antitumor, antioxidant and antiviral properties [9,10], causing a rise in seaweed derivatives on the markets, owing to these numerous health-promoting characteristics [11,12]. Besides, these products can not only be used in the fields of feed/food, nutraceuticals, and/or cosmetics, but also as fodder fertilizer and for biofuels' production, which thus enhance the blue biotechnologies' economy [13]. Some of the seaweeds contain essential fatty acids, such as linolenic (C18:3) and linoleic acids (C18:2) [14]. Lipids and fatty acids produced by marine macroalgae could be transformed into biodiesel, which has similar qualities to the conventional diesel fuel and may be used either straight in current diesel engines or mixed with diesel from petrochemistry. The production of biofuels from seaweed is a green technology that could minimize environmental damages by limiting the over-exploitation of fossil fuels, expected to rise by 40% between 2010 and 2040 [15]. This is particularly true regarding the political stability in Europe and the strong dependence on fossil fuels and gas in 2022. Many of the studies have reported the contribution of macroalgae as renewable and economical sources to address climate change issues [16]. Shifting to renewable energies and/or new ways for making clean energies is, thus, of utmost interest.

Macroalgae have a higher photosynthetic capability than terrestrial plants, as well as high water and carbohydrate contents [17–20]. Factors such as the productivity, relative ease of growing, harvesting, and scalability are also major considerations for choosing a specific seaweed (raw and/or by-products from seaweed processing) as biofuel feedstock [17–20]. According to Chen et al. [20], macroalgae may produce a net energy of 11,000 MJ/t dry algae [21], in comparison to 9500 MJ/t from microalgae gasification. Brown seaweed contains quantities of fermentable sugars (laminarin, fucoidan, alginate, glucan-like, etc.) without the presence of lignin (as for terrestrial plants). It can thus be used in the macroalgae-based biorefinery technologies for producing biomethane, bioethanol, biodiesel, and bio-oils [20,21]. The red, green, and especially brown macroalgae were subjected to fermentation under anaerobic digestion, using different strains such as *S. cerevisiae* or *P. angophorae* to produce ethanol [22]. For instance, *L. hyperborean*, *J. rubens*, *U. lactuca* or *S. latifolium* from the Egyptian Mediterranean were characterized as bioethanol feedstock after fermentation [22]. Note that the various conversion methods are detailed in recent reviews, such as fermentation, anaerobic digestion, liquefaction, transesterification, or pyrolysis [20,21]. Aboulkas et al. showed that 24.1% and 44% of bio-oil and biochar can be obtained prior to a pyrolysis conversion from the Moroccan *G. sesquipedale* [23]. High quality biodiesel production was reported after some transesterification steps by using *P. padina* from the Abu Qir Bay in North Africa [24].

Tunisia, with 1300 km of Mediterranean Sea coastlines, aims to develop the exploitation of macroalgae for creating new operational sectors in energy. *Halopteris scoparia*, belonging to the phaeophyceae species, is an abundant brown seaweed on the Tunisian north coast, which is still in the process of having its worth evaluation. To our knowledge, no other works to date have covered the bioconversion potential of *H. scoparia*. Thus, this work aims to provide a proof of concept for using *H. scoparia* biomass (as well as some of the by-products generated after the extraction of its high-value biomolecules) as a material to produce various types of energy vectors [25,26]. Thus, Bioethanol, H₂, and lipids were, respectively, produced by fermentation (*Saccharomyces cerevisiae*) and dark fermentation (microbial consortium and *Yarrowia lipolytica*). The results could contribute to the integration

of *H. scoparia* into a global biorefinery conversion process in Tunisia, and more generally in Maghreb.

2. Materials and Methods

2.1. Algal Biomass

The *H. scoparia* biomass was gathered in February 2020 from Tabarka city, which is in the north-west of Tunisia (36°57'36.223" N and 8°45'12.018" E). After harvesting, the thalli were rinsed with distilled water to remove the salts and dried for 20 days at 50 °C [27]. The dried samples were then pulverized into a powder size of 16–40 µm using a blender (Moulinex, France). This item was labeled as the raw seaweed and given the abbreviation "RSF" (Raw Seaweed Fraction). Two further fractions were employed in this study. They were generated after the extraction and purification of the polysaccharides and pigments from the *H. scoparia* dry biomass [27] and were, respectively, termed "BP1-PS" and "BP2-F". The BP1-PS is a by-product obtained from the carbohydrates' (fucoidan/alginate) extraction. Briefly, after depigmenting and delipidating the dry biomass (100 g) using acetone (1.4 L) and methanol (0.6 L) treatment (twice) for 24 h at 25 °C, the obtained biomass (75 g) was treated for 2 h at 60 °C with chlorohydric acid (0.1M, pH = 2) to extract the fucoidans, then filtered and treated with Na₂CO₃ (3%, pH = 11) at 60 °C to extract the alginates, then dried for 24 h at 50 °C [23,24]. The BP2-F is a by-product obtained from the depigmented biomass with successive treatments, using methanol to remove all of the pigments for a 72 h period at 25 °C under stirring (250 rpm). After filtering, the biomass was collected and dried for 24 h at 50 °C [28,29].

2.2. Algal Biomass Characterization and Chemicals Constituents

2.2.1. Carbohydrate Content of the Three Fractions

The nonenzymatic gravimetric technique was used to determine the total polysaccharides of RPS, BP1-PS, and BP2-F (AOAC Official Method 993.21) [30,31]. One hundred mg of RPS and BP1-PS were depigmented with acetone (1400 mL) then delipidated with methanol (600 mL) for 14 h at room temperature with moderate stirring. The obtained suspensions were filtered using a fine mesh strainer with a porosity of 16–40 µm. RPS, BP1-PS and BP2-F previously depigmented and delipidated were macerated in ultra-pure water (100 mL) for 4 h at 80 °C under gentle stirring (400 rpm). Cold ethanol 96% (300 mL, −20 °C) was used to precipitate the polysaccharides fractions. The suspensions were centrifuged at a rate of 20,000 × *g* for 20 min at 4 °C, and the pellets were recovered. The following ethanolic precipitation cycle was completed three times. After that, the pellets were suspended in ultra-pure water (50 g/L) and freeze dried. From these fractions, the total carbohydrate contents were determined using the Dubois colorimetric technique, and the reducing sugars using the bicinchoninic acid method, both using glucose as standard [32,33].

2.2.2. Phenolic Content

Ultrasound was used to quantify the phenolic chemicals RPS, BP1-PS, and BP2-F (main fractions from Section 2.1). Ten g of the dried macroalgae were mixed with 200 mL of acetone (80%) and incubated for 45 min at 4 °C, 120 W, and 40 KHz. The suspension was then centrifuged (5000 × *g* for 10 min at 4 °C), and the supernatant was collected and dried, using a rotary evaporator (Stuart RE300B, Stone, UK) at room temperature [34]. The total phenolic content was determined using the Folin–Ciocalteu technique, established by Singleton (1965) and using Gallic acid as the standard [35].

2.2.3. Composition in Chemical Elements

This composition was determined after heating the RPS, BP1-PS, and BP2-F at 550 °C for 6 h. Prior to an acidic treatment with 5 mL chlorohydric acid (37%) and 5 mL nitric acid (2M), the ions concentrations for the fractions were assessed, using an Atomic Absorption Spectroscopy (iCETM3300, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) [36].

2.2.4. Lipid Extraction

The Soxhlet technique was used to determine the total lipids of the RPS, BP1-PS, and BP2-F. In a nutshell, 500 mg of each of the fractions were inserted in a thimble in a Soxhlet extractor, along with 170 mL of the hexane in a round-bottomed flask for 4 h at 60 °C, followed by 40 min of solvent distillation. After 30 min of hexane evaporation using a rotary evaporator at 55 °C (Stuart RE300B, Bibby Scientifics, Stone, UK), the round-bottom flask was placed in an oven to be weighted, and the percentage of lipids that it contained was determined [37].

2.2.5. Ash, Moisture, and Protein Contents

The dry weight (DW) of the RPS, BP1-PS, and BP2-F was measured, using the AOAC technique, by drying 0.5 g of each sample in an air oven at 105 °C for 24 h. The ash content was calculated after drying 50 mg of RPS, BP1-PS, and BP2-F in a furnace at 550 °C for 4 h. The protein content in the RPS, BP1-PS, and BP2-F was quantified, using the Kjeldahl test and an AOAC International nitrogen conversion factor of 6.25 (method 981.10) [38].

2.3. Fermenting Microorganism, Medium Culture, and Production Process

2.3.1. Ethanol Production

Saccharomyces cerevisiae ATCC 7754 was used to produce bioethanol [39]. The experiment was conducted in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of culture medium, described by Kristiansen (1994), and consisting of glucose (50 g/L); yeast extract (3 g/L); monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) (5 g/L); ammonium sulfate (NH_4)₂SO₄ (2 g/L); KCl (120 mg/L); CaCl₂ · 2H₂O (60 mg/L); MgCl₂ · 2H₂O (520 mg/L); FeSO₄ · 6 H₂O (35 mg/L); MnSO₄ · H₂O (3.8 mg/L); CuSO₄ · 5 H₂O (0.5 mg/L); thiamine-chlorohydric acid (5 mg/L); pyridoxine-chlorohydric acid (6.25 mg/L); nicotinic acid (5 mg/L); D-biotin (0.125 mg/L); pantothenic acid (6.25 mg/L); myo-inositol (125 mg/L) and traces of ZnSO₄ · 7 H₂O (2.3 µg/L); CoSO₄ · 4 H₂O (2.3 µg/L); NaMoO₄ · 2 H₂O (3.3 µg/L); H₃BO₃ (7.3 µg/L); KI (1.7 µg/L); NiSO₄ · 6 H₂O (2.5 µg/L) [40].

The *S. cerevisiae* was inoculated in snugly closed flasks and fermentation was carried out for 48 h at 30 °C under gentle stirring of 200 rpm (INFORS HT, Bottmingen, Switzerland). The biomass growth was measured at 550 nm. To estimate the ethanol production, 5 mL were taken and centrifuged at 10,000 × g for 5 min at 25 °C every 6 h. Before further investigation, 1 mL of each supernatant was deproteinized with 125 mL of barium hydroxide solution (0.3 M) combined with 125 mL of zinc sulfate solution (5% w/v) and centrifuged at 10,000 × g for 5 min at 25 °C. The ethanol was quantified using a high-performance liquid chromatography (HPLC) apparatus (1260 Infinity Quaternary LC system, Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA) outfitted with two ionic exclusion columns in series (Rezex ROA 300 7.8 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). The samples were filtered using a cellulose acetate filter (0.2 µm), injected (10 µL), and eluted in an aqueous sulfuric acid solution (5 mM) mobile phase at a flow rate of 0.7 mL/min and 50 °C. The ethanol concentrations were measured using a refractometer (HP 1100 series, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) and an ethanol standard curve (0 to 100 g/L). The M8620AA OpenLAB Data Store Software A.02.01 was used to analyze the results.

2.3.2. Hydrogen and Volatile Fatty Acid Productions

For biohydrogen generation via anaerobic fermentation, the microbial consortium was chosen from a sewage treatment facility and treated with 2-bromoethanesulfonate in a complete medium to minimize the methane production from the archaea and to stabilize the community [26]. The composition of this culture medium was: K₂HPO₄ (18 g/L); KH₂PO₄ (18 g/L); (NH₄)₂SO₄ (72 g/L); NaCl (12 g/L); MgSO₄ · 7H₂O (1.2 g/L); CaCl₂ · 2H₂O (1.2 g/L); MnSO₄ · 6H₂O (0.15 g/L); CoCl₂ · 6H₂O (0.015 g/L); FeSO₄ · 7H₂O (0.4 g/L); H₃BO₃ · H₂O (6 g/L); ZnCl₂ (8.2 g/L); NiCl₂ · 6H₂O (2.6 g/L); CuCl₂ · 2H₂O (1.5 g/L); Na₂MoO₄ · H₂O (2.6 g/L); FeCl₂ · 4H₂O (75 g/L); hemin (0.12 g/L); biotin (0.24 g/L); PABA (0.12 g/L); resazurin (0.12 g/L).

This culture medium was supplemented with glucose at concentration of 20 and 10 g/L in, respectively, the pre-culture and final culture. Other components, such as L-cysteine (0.6 g/L) and carbonates (Na_2CO_3) (4.8 g/L), were also added to remove the oxygen and maintain the pH 6, respectively [41]. The pre-cultures were prepared in flasks (90 mL) with 10 mL of consortium for 12 h at 30 °C with stirring (150 rpm). The cultures were then degassed and sterilized before being inoculated with 10 mL of inoculum from pre-cultures, with biomass contents of 10 g/L. The fermentation took place at 30 °C with a stirring rate of 150 rpm [42]. A spectrophotometer (Biomate 3S, UV/vis spectrophotometer, Thermo Scientific, France) was used to measure the turbidity at 600 nm. After 24 h, 5 mL of the culture broth was sampled and centrifuged at $10,000\times g$ for 5 min at 25 °C. One mL of the obtained supernatant was treated and analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC), as previously detailed (Section 2.3.1), to quantify the concentrations of the volatile fatty using acetate (1.25 to 20 g/L), propionate (1 to 20 g/L), and butyrate (1 to 20 g/L) as the standards.

After 24 h of anaerobic fermentation, the biogas volume was quantified using a Terumo[®] syringe. Its quality and composition, particularly the biohydrogen concentration, were determined by a micro-gas chromatograph (Agilent 3000 A, Agilent Technologies, France) with two channels and a thermal conductivity detector. The hydrogen content was measured in the first channel, which was outfitted with a 5 Å column at 60 °C and 30 psi. The obtained data were quantified using the Soprane software [26].

2.3.3. Biodiesel Production

The *Yarrowia lipolytica* (MUCL 28849) was from the BCCM/MUCL (Agro) Industrial Fungi and Yeasts Collection in Belgium [43]. The *Y. lipolytica* was kept at 4 °C on potato dextrose agar. The growth medium was made up of: K_2HPO_4 (3 g/L); Na_2HPO_4 , H_2O (3 g/L); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g/L); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.040 g/L); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.016 g/L); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.0038 g/L); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.023 g/L); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.5 mg/L); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0009 g/L); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.00006 g/L); and H_3BO_3 (0.003 g/L), supplemented by 10 mL/L of a mineral stock solution containing MnSO_4 (0.38 g/L); H_3BO_3 (0.3 g/L); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4 g/L); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.6 g/L); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2.3 g/L); and 1 mL/L of metals' stock solution composed of $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.06 g/L); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/L); and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.9 g/L) [44]. To prevent precipitation, the pH was lowered to 4.5 with orthophosphoric acid 85% before sterilization and subsequently to 6 with KOH 1 M following sterilization. The yeast preculture was prepared by inoculating 200 mL of medium culture containing glucose (4 g/L) with the *Y. lipolytica* colonies picked from an agar plate and keep for 24 h at 30 °C in a rotary incubator shaker at 100 rpm (INFORS HT, Multitron Standard, Switzerland). Ten mL of pre-culture were used to make cultures with various substrates, RPS, BP1-PS, and BP2-F (2 g/L). Glucose (2 g/L) was used as the positive control.

The cultures were incubated at 30 °C at 200 rpm in the same rotary shaker, and 5 mL of each culture was collected every 5 h. High pressure homogenization was used to disrupt the cells in the samples, through a nozzle at 2500 bar pressure (Constant System Limited, Low March, Daventry NN11 4SD, UK). Half a mL of each collected sample was homogenized with 4 mL of chloroform, 2 mL of methanol, and 1 mL of distilled water. The mixture was then separated into an aqueous superior phase and a lower phase containing the extracted lipids by a centrifugation for 10 min at $2000\times g$. The organic phase was then pooled in pre-weighed tubes in 1 mL increments. After evaporating the solvent, the lipids were recovered using a speed-vacuum at 40 °C for 120 min until reaching a constant weight. The lipids were suspended in chloroform and kept at −20 °C. The transesterification was completed, and the fatty acid methyl esters' profile was analyzed, using the method of Morrison and Smith [36]. One hundred mL of the sample were combined with 800 mL of MeOH/ BF_3 (14%) and placed in a water bath at 100 °C for 15 min. After cooling the mixture, 1.5 mL of water was mixed with 750 mL of hexane containing heptadecane, 1% (*v/v*) was added, and 1 mL of the mixture was finally injected and analyzed by gas chromatography

(HP6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with a Supelco SPB-5 (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) capillary column (30 m × 0.32 mm × df 0.25 mm), using nitrogen as a gas vector at 0.80 mL/min and flame ionization as a detector (280 °C). The rise in the temperature was from 170 °C to 220 °C, at a rate of 3 °C/min, for 3 min. The injector was set at 250 °C. The identification of the methyl esters was made by comparing the retention times with known standards. The obtained data were analyzed using MestReNova 7.1.

2.4. Statistical Analyses

All the statistics were determined using the statistical software SigmaPlot 12.5 (Systat Software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data were expressed as mean ± standard deviation of three replicates. A *t*-test and post hoc procedures (Tukey test) were performed to compare the data and analyze the pairwise differences. The differences were considered significant for $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Chemical Constituents

3.1.1. Ash, Moisture, Proteins, Fats, and Phenolic Contents

The *H. scoparia* biomass and by-product compositions are given in Table 1. A qualitative study of *H. scoparia* shown that the raw biomass contains 3% fat and 7% proteins. According to the literature, the protein content in brown algae can range from 3% to 15% [45], but the fat content is around 5%, as with the total lipids content in *A. nodosum*, 4.46% [46]. The ash and moisture contents of the dried *H. scoparia* were, respectively, 43% and 7%, which is consistent with previous studies reporting that the ashes could vary from 24% to 49% and the moisture between 4% and more than 18%, depending on the season and the genus of the brown seaweed [47–49]. For instance, *H. scoparia* presented a low moisture content which agreed with the values reported for *Undaria pinatifida*, a seaweed used for biofuel production [50]. Furthermore, this macroalgae had 4.4% of phenolic content which is close to the content found for another brown Tunisian seaweed, e.g., *Cystoseira compressa*, with a value of 4.8% [51,52]. It is noteworthy that the harvesting period is an important parameter that can indirectly affect the macroalgal biomass availability and its biochemical composition [53].

Table 1. *H. scoparia* (RPS) and by-products' composition after carbohydrate (BP1-PS) and fucoxanthin (BP2-F) extractions.

Composition % (<i>w/w</i>)	<i>H. scoparia</i> (RPS)	By-Product after Carbohydrate Extraction (BP1-PS)	By-Products after Fucoxanthin Extraction (BP2-F)
Fat	2.92 ± 0.28	1.5 ± 0.52	0.93 ± 0.6
Protein	6.53 ± 0.56	1 ± 0.5	0.87 ± 0.71
Ash	42.63 ± 2.2	47.34 ± 1.4	35.41 ± 2.5
Moisture	6.79 ± 0.16	7.57 ± 0.16	9.06 ± 0.45
Phenolic content	4.4 ± 0.005	0.43 ± 0.0003	0.29 ± 0.0005

This biochemical composition provides information that could be useful in performing the appropriate pretreatments to make *H. scoparia* more suitable for energy production. According to Suutari et al., the protein level can impact the microbial bioconversion of macroalgae [54]. For example, a high protein content (7–20%) can reduce the biohydrogen production [55]. Furthermore, it has been shown that the bioconversion of macroalgae with a high soluble protein content can produce toxic ammonia [55]. In the case of brown macroalgae, the microbial degradation of the constitutive proteins was inhibited, due to their cellular localization and linkages with cell wall polysaccharides [56]. Hou et al. reported that the bioethanol production after macroalgae bioconversion was correlated with their carbohydrate contents, rather with their protein contents [57]. In addition, because of the low lipid concentrations, the production of biofuels from *H. scoparia* primarily depends

on their carbohydrate conversion to bioethanol production, and secondly on their fatty acids' transesterification capacity to produce biodiesel.

The ash content from *H. scoparia* seemed to be high and reflected its mineral content. It can provide functional micronutrients serving to enhance biological conversion, such as anaerobic digestion [58]. In this regard, in comparison to the thermal conversion, biological processing is the most ideal conversion procedure for algae since the algae are the most tolerant of ash content [59]. Regarding the literature, the high quantity of ash increases the onset of the pyrolysis process and then the bio-oil yields. So, *H. scoparia* could produce a low bio-oil yield via fast pyrolysis behavior, due to its high content of ash. According to Bae et al., some of the pretreatments are beneficial for ash reduction [60], but excessive quantities of ash (> 20%) can generate slagging and fouling, which is a key issue for biofuels production [61].

3.1.2. Composition in Chemical Elements

H. scoparia (RPS) contains macro-, microelements, and heavy metals (Table 2). According to the literature, the levels of these elements can significantly change depending on the species [45]. *H. scoparia* contained lower levels of different micro-, macroelements, and heavy metals than in the *F. vesiculosus* or other French edible macroalgae that are considered suitable for food. This composition highlighted the low food potential of this seaweed and encouraged investigating its bioconversion potential [61]. Note that *H. scoparia* also contained alkali metals, such as K and Na. According to Ross et al., these elements derived from the macroalgae biomass may cause problems with fouling and slagging in gasification and biohydrogen production [62]. The high alkali metal concentrations may also cause the inhibition of bioethanol production [62]. Thus, it is of the utmost importance to identify and quantify these various chemical elements, which allows the determination of whether a particular pretreatment must be applied to the seaweed to reduce the concentration of ash and undesirable chemical elements [62].

Table 2. Composition in chemical elements of *H. scoparia* (RPS).

Chemical Elements	mg/kg DW ¹
P	29.950 ± 0.008
Ca	19.919 ± 0.003
K	15.689 ± 0.037
Na	10.350 ± 0.097
Mg	8137.5 ± 0.056
Fe	3946.75 ± 0.023
Mn	51.5 ± 0.005
Ni	23.75 ± 0.008
Zn	23.55 ± 0.012
Cu	6.95 ± 0.01
Pb	4 ± 0.01

¹ DW: dry weight.

3.1.3. Sugars' Contents

As shown in Table 3, the total carbohydrate content in *H. scoparia* (RPS) represented 133.9 g/kg, which was much higher than for the carbohydrates' content reported from *S. vulgare* (31.03 ± 6.59 g/kg) [46], or from *C. barbata* (9.6 g/kg) [47]. Note that the brown seaweeds were reported as showing a higher content of carbohydrates during the spring [48]. The BP1-PS and BP2-F fractions were still composed of carbohydrates with, respectively, 79.02 ± 0.03 g/kg and 113.20 ± 0.04 g/kg. The significant difference ($p < 0.05$) between each fraction comes from the extraction methodology, where the BP2-F (obtained after pigment extraction) was not depleted in carbohydrates in comparison to the BP1-PS. These carbohydrate contents, as well as the reducing sugars' values for the by-products, were still close to the quantities reported for raw brown macroalgae, such as *Sargassum obtusifolium*

and *Rosenvingeana nhatrangensis* (123 and 12.6 g/kg, respectively) [49], which highlights their potential as feedstock materials for fermentation, etc.

Table 3. Total and reducing sugars contents.

Samples (g/kg DW)	Total Sugars (g/kg)	Reducing Sugars (g/kg)
RPS	133.9 ± 0.12	39.5 ± 0.05
BP1-PS	79.02 ± 0.03	15.73 ± 0.09
BP2-F	113.20 ± 0.04	15.26 ± 0.02

3.2. Biofuels' Production from *H. scoparia* and By-Products of Extraction

3.2.1. Production of Bioethanol

The RPS, BP1-PS and BP2-F were subjected to solid state fermentation and used as substrates to generate bioethanol from *Saccharomyces cerevisiae* ATCC7754. This strain was selected owing to its ability to produce important ethanol concentrations, regarding its low sensibility to a high concentration of ethanol, high selectivity for fermentable sugars such as glucose, galactose, and mannose during fermentation, and the capacity to produce a low quantity of by-products [50,51]. Figure 1 shows the evolution of bioethanol production simultaneously with the consumption of fermentable sugars from the RPS, BP1-PS and BP2-F fractions for 72 h. According to the theoretical yield of Gay-Lussac for ethanol production from glucose (0.51 g ethanol/g glucose), around 5.2 g/L of ethanol was produced for the positive control.

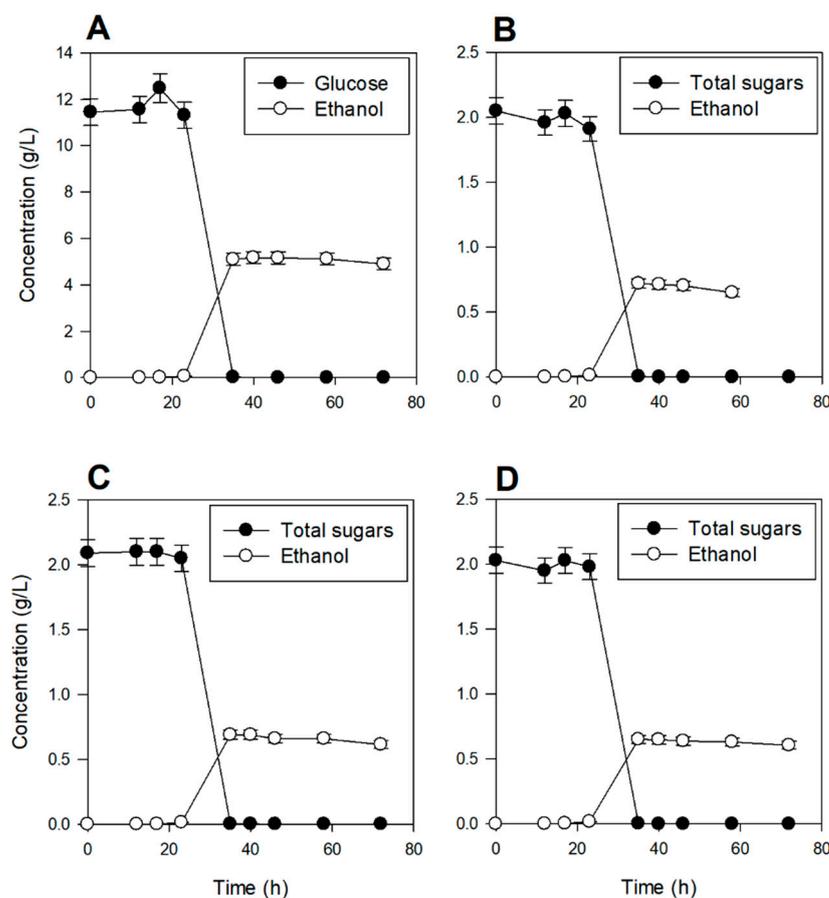


Figure 1. Production of ethanol from (A) glucose (positive control); (B) RPS; (C) BP1-PS; and (D) BP2-F fractions. The standard deviations were lower than 5%.

Due to their content of reducing sugars (Table 3), each of the other substrates allowed the production of ethanol, with concentrations ranging from 0.65 to 0.72 g/L during the

three days of fermentation, without a significant difference ($p > 0.05$). This corresponded to 0.35, 0.345, and 0.325 g ethanol/g DW for RPS, BP1-PS, and BP2-F, respectively. The difference between the ethanol production from BP1-PS and BP2-F was explained by the slight difference in the initial content of the reducing sugars. The difference between the yield of ethanol produced from BP1-PS and BP2-F and the yield of RPS could be due to the phenolic compounds present in RPS, which is higher than those of the two by-products (4.4%). Chen et al. showed that the phenolic compounds can affect the fermentation ability of *S. cerevisiae* and reduce ethanol production due to their antimicrobial properties [63]. These results were higher than those reported for the untreated macroalgae *Saccharina japonica* (0.281 g ethanol/g DW) or *Laminaria japonica* (0.28 g ethanol/g DW) [52]. According to Obata et al., this change could be explained by the difference in the constitutive fermentable sugar characteristics of each macroalgae [64].

Better results were reported for the pretreated (mechanical, acid pretreatments, and enzymatic hydrolysis) brown seaweed materials from *Sargassum vulgare* or *Padina tetrastrumatica*, with some yields close to 0.38 and up to 0.66 g ethanol/g DW [12]. For instance, washing, drying, milling, and heating (121 °C for 20 min in an autoclave) macroalgae can be efficient in releasing fermentable biomolecules, by breaking down the outer layer of the cell wall and increasing the surface area [53,54]. Combining the mechanical pretreatment with the use of enzymes can also reduce the generation of fermentation inhibitors [65,66]. Thus, further experiments should be planned to enhance the ethanol production by pretreatment, in particular RPS for more exposing and/or generating of fermentable polymers, oligo- and monomers [65–67]. Other studies highlighted that not only the enzymatic steps can affect the fermentation yields, since additional elements can change the bioethanol production. Mutripah et al. showed that an acid hydrolysis of the seaweed using 0.2 M H₂SO₄ before treatment at 121 °C for 15 min allowed the generation of the reducing sugars' content of about 60 g/kg DW [68]. *P. australis* was also composed of around 145 g/kg DW total carbohydrates, which was close to the values for *H. scoparia* (133 g/kg DW). However, the use of the *H. scoparia* biomass as a fermentation substrate resulted in a higher ethanol yield (0.35 g ethanol/g DW) than that reported for *P. australis* (0.002 g ethanol/g DW). This finding could be due to the high level of 5-HMF and levulinic acid obtained after hydrolysis using H₂SO₄, which could inhibit the fermentation process [68]. It clearly shows the importance of choosing the appropriate hydrolysis pretreatment for significantly enhancing the bioethanol production. Using various enzymes in the mix, such as recombinant alginate lyases, oligo-alginate lyases, and cellulases, can increase the ethanol yields, as reported for the *M. pyrifera* biomass [69]. The authors confirmed that enzymatic treatments could be sufficient for increasing glucose liberation, avoiding the fermentative issues caused by acid and/or thermal pretreatment [69].

The selection of suitable fungal or microbial strains is a crucial aspect of the fermentation process. Identifying the organisms able to convert heterogeneous sugars is still a challenge in bioethanol production from macroalgae [70]. Indigenous halotolerant marine yeast could be used in the fermentation process, considering their tolerance to high contents of salts in ash [71]. It has been outlined that the use of *Candida* sp. could increase the ethanol yield by up to 1.76% for the macroalgae *Kappaphycus alvarezii*, despite the high salt concentrations [71]. Offei et al. [70] reported that acclimatizing yeasts to higher concentrations of some substrates was a way of increasing ethanol output. This was accomplished employing a two-stage fermentation of the hydrolysates from *S. japonica* [72]. *S. cerevisiae* KCCM 1129 was used in the first fermentation stage of *S. japonica* to convert the glucose content into ethanol, while *P. angophorae* KCTC 17574 was utilized in the second fermentation stage to convert the mannitol content into ethanol. The acclimatized *P. angophorae* KCTC 17574 was able to produce about 0.3 g ethanol/g mannitol, instead of 0.13 g ethanol/g mannitol for the non-acclimatized one.

Moreover, the fermentation technique, which simultaneously used saccharification and fermentation (SSF), is reported to be a more productive method than splitting hydrolysis and fermentation (SHF). It saves time, reduces the number of needed unit operations, and

decreases the contamination issues. The SSF method may enhance the level of bioethanol production by avoiding end-product inhibition and the potential loss of sugars [73].

3.2.2. Production of Hydrogen and Volatile Fatty Acids

Figure 2 illustrates the volatile fatty acids (VFAs) and the biohydrogen production of the bacterial consortium for 24 h (dark fermentation), using RPS, BP1-PS, and BP2-F fractions as the substrates. Glucose was the positive control (1.85 g/L butyrate, 479 mg/L acetate, 72 mg/L propionate, 40 mL H₂/g glucose corresponding to 43% H₂ in the total biogas). The results highlighted that each fraction can be used as feedstocks for generating biohydrogen, i.e., 1.3 mL H₂/g DW (around 1/3 of the yield by using glucose).

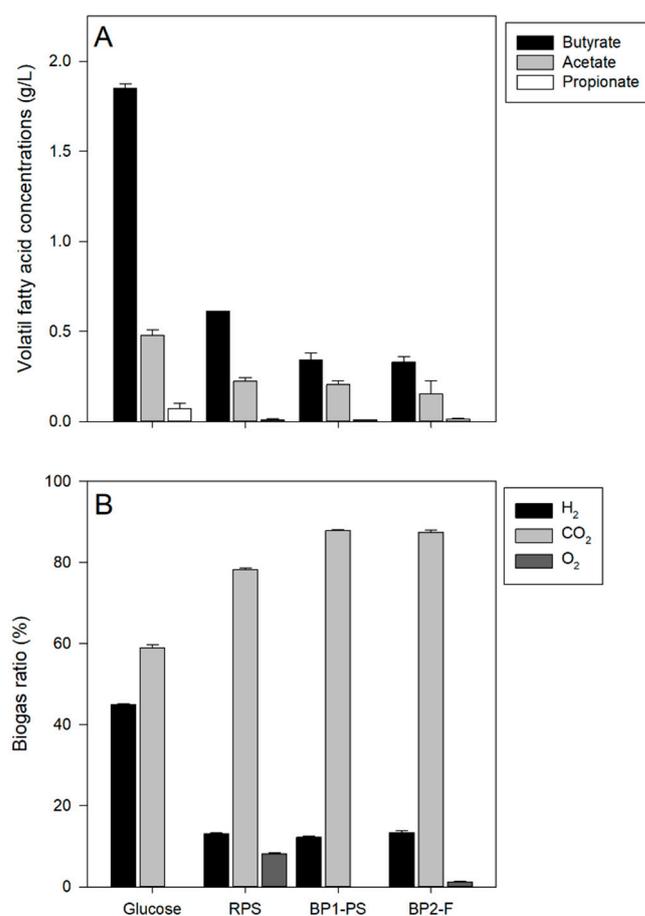


Figure 2. Production of (A) VFAs and (B) bio-hydrogen from RPS, BP1-PS, and BP2-F fractions, using glucose as positive control.

Regarding the literature, these results were lower than those observed, for example, by using *Huzikia husiforme* sp. (10.3 mL H₂/g DW) [74] or the brown seaweed *L. japonica* (58.5 mL H₂/g DW) as substrates, noting that pretreatments have been applied (acid, alkali, or enzymatic hydrolysis step) for generating more sugars to enhance the level of biohydrogen production [75,76]. However, the yield of H₂ produced from *H. scoparia* (13 mL H₂/g DW) was slightly higher than the one reported from non-treated *L. japonica* (10 mL H₂/g DW) [77]. The H₂ production was coupled in the experiments with two preferential biosynthesis pathways for the bacterial consortium [20], one producing acetate, and the second one butyrate. A significant difference ($p < 0.05$) was observed regarding the butyrate concentration (612 mg/L) which was two times higher using the RPS than the BP1-PS and BP2-F fractions. This result comes from the content of reducing sugars, which represented 39.5 g/kg DW in the RPS. The acetate concentrations were close to 154, 205, and 225 mg/L for BP2-F, BP1-PS, and RPS, respectively, without a significant difference. These

data were slightly lower than those reported, for example, from *L. japonica*, *P. elliptica*, and *E. critina* to produce butyric acid (1.9, 2.5, and 2.8 g/L, respectively), acetic acid (4.5, 2.2, and 2.8 g/L, respectively) or propionate (0.6, 0.4, and 0.4 g/L, respectively) [20,74,75]. Having a balanced C:N ratio of 20–30 should help in increasing the productivity, as reported by some papers [20,76–78]. According to the literature, many factors, such as pH, can affect the yield of H₂ production from macroalgae. Thus, the optimal pH to produce biohydrogen from various biomasses can vary between 5.2 to 7, butyrate being the main VFA, produced at pH 7 [79]. So, the butyrate pathway was preferentially used by our consortium to produce biogas from *H. scoparia*; the acetate and propionate being produced in a second step [79].

To increase the H₂ production, heat pretreatments of the biomass could be of crucial importance, in particular to liberate specific alditols and sugars, which could be finally converted into pyruvate, H₂, butyric acid, and acetate. This pretreatment step seems beneficial when considering the difficulty of mannitol fermenting in anaerobic conditions. Liu et al. showed that the heat pretreatment of *L. japonica* (200 °C) produced a maximum of H₂ yield close to 85.45 mL H₂/g DW, in comparison with the untreated biomass (10 mL H₂/g DW) [80]. The relative amount of H₂ produced from *H. scoparia* may also be due to the low initial substrate concentration (1%). Indeed, many of the studies have reported the effect of substrate concentrations on H₂ production. For example, using *L. japonica* (pH = 6), the optimal substrate concentration was 2% to produce the maximum yield of biohydrogen (75.88 mL H₂/g DW) [80]. Thus, further experiments should be planned to enhance the biohydrogen production from RPS, BP1-PS and BP2-f and by-products for biofuel production since it can still be considered a potential but mid-term suitable alternative for energy production.

3.2.3. Biodiesel Production

The time-course measurements of lipids produced by *Y. lipolytica* are shown in Figure 3. The positive control allowed the release of 155 mg/L of lipids after 84 h. The RPS, BP1-PS and BP2-F fractions showed significant differences ($p < 0.05$) in terms of the lipids' concentrations, with some values of 30.5, 1.6 and 13.3 mg/L, respectively. These substrates showed a low potential, probably because of the presence of high nitrogen concentrations in the media and the unbalanced initial C:N ratio, leading to a low yield in the lipid contents [76–78]. Moreover, *Y. lipolytica* is not able to use the VFAs produced in the medium culture for making intracellular lipids. The total lipids content is the principal indicator of biodiesel production from macroalgae. Thus, *H. scoparia* is characterized by a lipid content close to 3% DW. This low total lipid content was in concordance with the literature. Song et al. reported that the level of lipids from brown macroalgae was below 5% DW [81]. In addition, it was observed that the brown macroalgae *S. trinodis* present 1.25% of total lipids, highlighting the low potential of this seaweed for biodiesel production [82]. Regarding literature, the fluctuation in the lipids' levels is influenced by the environmental conditions as well as the intrinsic potential of macroalgae [82].

It is noteworthy that the compositions of fatty acids, as described in Table 4, were closely the same for all the fractions with linoleic (C18:2) and oleic (C18:1) acids representing around 80%, which was consistent with the literature [20]. Liang et al. reported that the composition of fatty acids from soybean and *Jatropha* oils used for generating biodiesel in the United States and European Union was like the composition of fatty acids obtained from lipids, using *H. scoparia* as a carbon source [83]. Fei et al. also showed that the profile of fatty acids, using glucose or VFAs as a carbon source of the lipid accumulation from *C. albidus*, was close to the profile given in Table 4 [83].

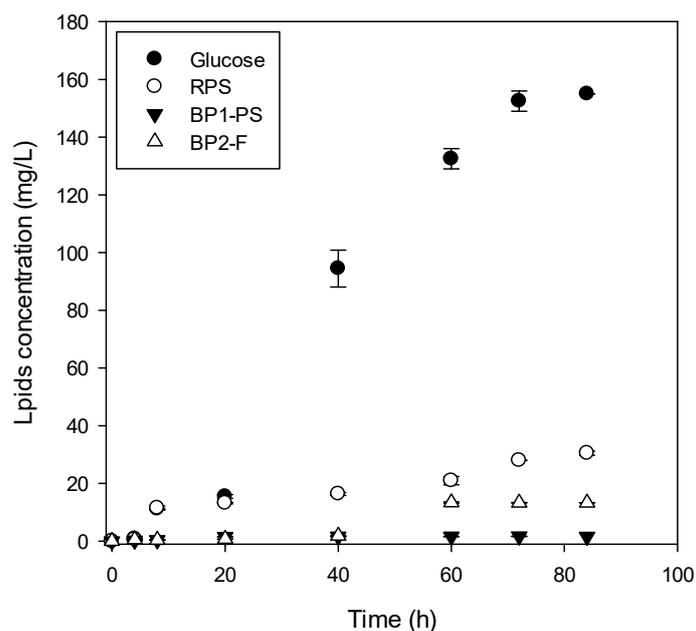


Figure 3. Production of lipids by *Y. lipolytica* fermentation from medium enriched with RPS, BP1-PS, and BP2-F fractions, and using glucose as positive control.

Table 4. Fatty acids' composition of lipids produced by *Yarrowia lipolytica* from RPS, BP1-PS, and BP2-F.

Fatty Acids Composition	%
Palmitic acid C16:0	11
Palmitoleic acid C16:1	10
Stearic acid C18:0	1
Oleic acid C18:1	28
Linoleic acid C18:2	51
Linolenic acid C18:3	1

These authors also showed that pretreatments are a crucial step to achieve high yields of carbohydrates (alginate and mannitol) or VFAs to be used by oleaginous yeast, such as *Y. lipolytica*, to produce high quality biodiesel. Indeed, the type of fatty acids and the ratio between the SFAs (saturated fatty acids) and UFAs (unsaturated fatty acids) play an important role in determining the quality of biodiesel produced from macroalgae. The *H. scoparia* showed a UFAs > SFAs ratio [82]. The SFAs from *H. scoparia* were higher (11%) than the SFAs' contents reported from *S. trinodis* (1.167%) [82]. High quantities of the SFAs could also improve the stability of biodiesel, whereas high levels of UFAs may enhance the biodiesel fluidity. Thus, combining them correctly could lead and serve to producing biodiesel of a higher quality [82].

4. Conclusions

Transesterification, thermochemical, and biochemical are the principal processes to convert biomass into biofuels; the choice of one of these technologies still being related to the so-called bioconversion. *Halopteris scoparia*, which is an abundant brown seaweed found in Tunisia, showed a significant potential for being used as feedstock for energy conversion. Without an optimal run and specific pretreatment, it was possible to produce ethanol (0.35 g/g DW), H₂ (1.3 mL H₂/g DW), VFAs (612 mg butyrate/L, 225 mg acetate/L, 11 mg propionate/L) and a small quantity of lipids (30.5 g/L) from the raw macroalgae fraction (RPS). The feasibility of producing energy vectors by using some of the by-products from the extraction processes of high value molecules (polysaccharides, pigments) was also assessed. Further experiments should be planned, for instance by enhancing yields (e.g., pretreatments for upgrading the saccharification), directing metabolic flux using

various experimental parameters, or by changing the content of the inputs. Overall, this work completes the proof of concept for generating alternative and cleaner energy by setting up new processing sectors or making the concept economically viable of biorefinery from North African brown seaweeds. In addition, the processing of by-products to energy can reduce environmental impacts and increase the capacity of energy recovery in power generation.

Author Contributions: Conceptualization, G.P., G.C. and S.A.; methodology, F.H., G.P., G.C. and S.A.; validation, G.P., G.C. and S.A.; formal analysis, F.H., G.C. and G.P.; investigation, F.H., G.C. and G.P.; writing—original draft preparation, F.H., G.C., J.E., G.P. and S.A.; writing—review and editing, G.C., J.E., G.P. and S.A.; visualization, G.C., J.E., I.F., M.D.O.E.H., Z.E.A.-T., C.E.M., P.D., C.D., P.M. and G.P.; supervision, G.P., J.E. and S.A.; project administration, G.P.; funding acquisition, S.A., Z.E.A.-T., Z.B. and G.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by Campus France (41423UC), the Hubert Curien Program PHC Maghreb (EXPLORE 2019–2021, 19MAG36); the French Ministry of Europe and Foreign Affairs and the Moroccan, Algerian, and Tunisian Ministries of Higher Education and Scientific Research; the National Centre for Scientific and Technical Research (CNRST Morocco), grant number 4UCA2018.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Godvin Sharmila, V.; Kumar, D.; Pugazhendhi, A. Biofuel production from macroalgae: Present scenario and future scope. *Bioengineered* **2021**, *12*, 9216–9238. [[CrossRef](#)]
2. Hentati, F.; Delattre, C.; Gardarin, C.; Desbrières, J.; Le Cerf, D.; Rihouey, C.; Michaud, P.; Abdelkafi, S.; Pierre, G. Structural features and rheological properties of a sulphated xylogalactan-rich fraction isolated from Tunisian red seaweed *Jania adhaerens*. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 1655. [[CrossRef](#)]
3. Biris-Dorhoi, E.; Michiu, D.; Pop, C.; Rotar, A.M.; Tofana, M.; Pop, O.L.; Socaci, S.A.; Farcas, A.C. Macroalgae—A sustainable source of chemical compounds with biological activities. *Nutrients* **2020**, *12*, 3085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Bilal, M.; Iqbal, H. Marine seaweed polysaccharides-based engineered cues for the modern biomedical sector. *Mar. Drugs* **2019**, *18*, 7. [[CrossRef](#)]
5. Hentati, F.; Pierre, G.; Ursu, A.V.; Vial, C.; Delattre, C.; Abdelkafi, S.; Michaud, P. Rheological investigations of water-soluble polysaccharides from the Tunisian brown seaweed *Cystoseira compressa*. *Food Hydrocoll.* **2020**, *103*, 105631. [[CrossRef](#)]
6. Leandro, A.; Pacheco, D.; Cotas, J.; Marques, J.C.; Pereira, L.; Gonçalves, A.M.M.M. Seaweed's bioactive candidate compounds to food industry and global food security. *Life* **2020**, *10*, 140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Michalak, I.; Chojnacka, K. Algae as production systems of bioactive compounds. *Eng. Life Sci.* **2015**, *15*, 160–176. [[CrossRef](#)]
8. Mhadhebi, L.; Dellai, A.; Clary-Laroche, A.; Ben Said, R.; Robert, J.; Bouraoui, A. Anti-inflammatory and antiproliferative activities of organic fractions from the Mediterranean brown seaweed, *Cystoseira compressa*. *Drug Dev. Res.* **2012**, *73*, 82–89. [[CrossRef](#)]
9. Ktari, L.; Guyot, M. A cytotoxic oxysterol from the marine alga *Padina pavonica* (L.) Thivy. *J. Appl. Phycol.* **1999**, *11*, 511–513. [[CrossRef](#)]
10. El-Shafei, R.; Hegazy, H.; Acharya, B. A review of antiviral and antioxidant activity of bioactive metabolite of macroalgae within an optimized extraction method. *Energies* **2021**, *14*, 3092. [[CrossRef](#)]
11. Indira, K.; Balakrishnan, S.; Srinivasan, M.; Bragadeeswaran, S.; Balasubramanian, T. Evaluation of in vitro antimicrobial property of seaweed (*Halimeda tuna*) from Tuticorin coast, Tamil Nadu, southeast coast of India. *Afr. J. Biotechnol.* **2013**, *12*, 284–289. [[CrossRef](#)]
12. Ganesan, A.R.; Tiwari, U.; Rajauria, G. Seaweed nutraceuticals and their therapeutic role in disease prevention. *Food Sci. Hum. Wellness* **2019**, *8*, 252–263. [[CrossRef](#)]
13. Lordan, S.; Ross, R.P.; Stanton, C. Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 1056–1100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Saini, R.K.; Keum, Y.-S. *Omega-3* and *Omega-6* polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance—A review. *Life Sci.* **2018**, *203*, 255–267. [[CrossRef](#)]
15. Panahi, H.K.S.; Dehghani, M.; Aghbashlo, M.; Karimi, K.; Tabatabaei, M. Shifting fuel feedstock from oil wells to sea: Iran outlook and potential for biofuel production from brown macroalgae (*ochrophyta*; *phaeophyceae*). *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2019**, *112*, 626–642. [[CrossRef](#)]

16. Singh, A.; Olsen, S.I.; Nigam, P.S. A viable technology to generate third-generation biofuel. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2011**, *86*, 1349–1353. [[CrossRef](#)]
17. Dammer, L.; Carus, M.; Piotrowski, S.; Puente, A.; Breitmayer, E.; de Beus, N.; Liptow, C. Sustainable first and second-generation bioethanol for Europe: A sustainability assessment in the context of the European Commission's REDII proposal. *Ind. Biotechnol.* **2017**, *13*, 6. [[CrossRef](#)]
18. Aresta, M.; Dibenedetto, A.; Barberio, G. Utilization of macro-algae for enhanced CO₂ fixation and biofuels production: Development of a computing software for an lca study. *Fuel Process. Technol.* **2005**, *86*, 1679–1693. [[CrossRef](#)]
19. Levine, R.B.; Pinnarat, T.; Savage, P. Biodiesel production from wet algal biomass through in situ lipid hydrolysis and supercritical transesterification. *Energy Fuels* **2010**, *24*, 5235–5243. [[CrossRef](#)]
20. Chen, H.; Zhou, D.; Luo, G.; Zhang, S.; Chen, J. Macroalgae for biofuels production: Progress and perspectives. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *47*, 427–437. [[CrossRef](#)]
21. Konda, N.V.S.N.; Singh, S.; Simmons, B.; Klein-Marcuschamer, D. An investigation on the economic feasibility of macroalgae as a potential feedstock for biorefineries. *Bioenergy Res.* **2015**, *8*, 1046–1056. [[CrossRef](#)]
22. Soliman, R.M.; Younis, S.A.; El-gendy, N. Batch bioethanol production via the biological and chemical saccharification of some Egyptian marine macroalgae. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *125*, 422–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Aboulkas, A.; Hammani, H.; El Achaby, M. Valorization of algal waste via pyrolysis in a fixed-bed reactor: Production and characterization of bio-oil and bio-char. *Bioresour. Technol.* **2017**, *243*, 400–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. El Maghraby, D.; Fakhry, E. Lipid content and fatty acid composition of Mediterranean macro-algae as dynamic factors for biodiesel production. *Oceanologia* **2015**, *57*, 86–92. [[CrossRef](#)]
25. Yanagisawa, M.; Kawai, S.; Murata, K. Strategies for the production of high concentrations of bioethanol from seaweeds: Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds. *Bioengineered* **2013**, *4*, 224–235. [[CrossRef](#)]
26. Béligon, V.; Noblecourt, A.; Christophe, G.; Lebert, A.; Larroche, C.; Fontanille, P. Proof of concept for biorefinery approach aiming at two bioenergy production compartments, hydrogen and biodiesel, coupled by an external membrane. *Biofuels* **2018**, *9*, 163–174. [[CrossRef](#)]
27. Hentati, F.; Delattre, C.; Ursu, A.V.; Desbrières, J.; Le Cerf, D.; Gardarin, C.; Abdelkafi, S.; Michaud, P.; Pierre, G. Structural characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from the Tunisian brown seaweed *Cystoseira compressa*. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *198*, 589–600. [[CrossRef](#)]
28. Ermakova, S.; Men'shova, R.; Vishchuk, O.; Kim, S.-M.; Um, B.-H.; Isakov, V.; Zvyagintseva, T. Water-soluble polysaccharides from the brown alga *Eisenia bicyclis*: Structural characteristics and antitumor activity. *Algal Res.* **2013**, *2*, 51–58. [[CrossRef](#)]
29. Jaswir, I.; Noviendri, D.; Salleh, H.M.; Miyashita, K. Fucoxanthin extractions of brown seaweeds and analysis of their lipid fraction in methanol. *Food Sci. Technol. Res.* **2012**, *18*, 251–257. [[CrossRef](#)]
30. Barkallah, M.; Dammak, M.; Louati, I.; Hentati, F.; Hadrich, B.; Mechichi, T.; Ayadi, M.A.; Fendri, I.; Attia, H.; Abdelkafi, S. Effect of *Spirulina platensis* fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. *LWT Food Sci. Technol.* **2017**, *84*, 323–330. [[CrossRef](#)]
31. Chakou, F.Z.; Boual, Z.; Ould El Hadj, M.D.; Belkhalifa, H.; Bachari, K.; El Alaoui-Talibi, Z.; El Modafar, C.; Hadjkacem, F.; Fendri, I.; Abdelkafi, S.; et al. Pharmacological investigations in traditional utilization of *Alhagi maurorum* Medik. in Saharan Algeria: In vitro study of anti-inflammatory and antihyperglycemic activities of water-soluble polysaccharides extracted from the seeds. *Plants* **2021**, *10*, 2658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356. [[CrossRef](#)]
33. Waffenschmidt, S.; Jaenicke, L. Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-bicinchoninate. *Anal. Biochem.* **1987**, *165*, 337–340. [[CrossRef](#)]
34. Kumar, Y.; Singhal, S.; Tarafdar, A.; Pharande, A.; Ganesan, M.; Badgujr, P.C. Ultrasound assisted extraction of selected edible macroalgae: Effect on antioxidant activity and quantitative assessment of polyphenols by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Algal Res.* **2020**, *52*, 102114. [[CrossRef](#)]
35. Singleton, V.; Rossi, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158. [[CrossRef](#)]
36. Elleuch, J.; Hmani, R.; Drira, M.; Michaud, P.; Fendri, I.; Abdelkafi, S. Potential of three local marine microalgae from Tunisian coasts for cadmium, lead and chromium removals. *Sci. Total Environ.* **2021**, *799*, 149464. [[CrossRef](#)]
37. Ramola, B.; Kumar, V.; Nanda, M.; Mishra, Y.; Tyagi, T.; Gupta, A.; Sharma, N. Evaluation, comparison of different solvent extraction, cell disruption methods and hydrothermal liquefaction of oedogonium macroalgae for biofuel production. *Biotechnol. Rep.* **2019**, *22*, e00340. [[CrossRef](#)]
38. Mæhre, H.K.; Dalheim, L.; Edvinsen, G.K.; Elvevoll, E.O.; Jensen, I.-J. Protein determination—Method matters. *Foods* **2018**, *7*, 5. [[CrossRef](#)]
39. Bahry, H.; Pons, A.; Abdallah, R.; Pierre, G.; Delattre, C.; Fayad, N.; Taha, S.; Vial, C. Valorization of carob waste: Definition of a second-generation bioethanol production process. *Bioresour. Technol.* **2017**, *235*, 25–34. [[CrossRef](#)]
40. Soyez, K. Integrated design of a fermentation plant: The production of Baker's yeast. *Engineering* **1995**, *15*, 209–210. [[CrossRef](#)]
41. Gaudet, G.; Forano, E.; Dauphin, G.; Delort, A.M. Futile cycling of glycogen in fibrobacter succinogenes as shown by in situ 1H-NMR and 13C-NMR investigation. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *207*, 155–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Noblecourt, A.; Christophe, G.; Larroche, C.; Santa-Catalina, G.; Trably, E.; Fontanille, P. High hydrogen production rate in a submerged membrane anaerobic bioreactor. *Int. J. Hydrogen Energy* **2017**, *42*, 24656–24666. [[CrossRef](#)]
43. Fontanille, P.; Kumar, V.; Christophe, G. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* **2012**, *114*, 443–449. [[CrossRef](#)]
44. Christophe, G.; Deo, J.L.; Kumar, V.; Nouaille, V.; Fontanille, P.; Larroche, C. Production of oils from acetic acid by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *167*, 1270–1279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Fleurence, J. Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, *10*, 25–28. [[CrossRef](#)]
46. Miyashita, K.; Mikami, N.; Hosokawa, M. Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids. *J. Funct. Foods* **2013**, *5*, 1507–1517. [[CrossRef](#)]
47. Rosell, K.G.; Srivastava, L.M. Seasonal variation in the chemical constituents of the brown algae *Macrocystis integrifolia* and *Nereocystis luetkeana*. *Can. J. Bot.* **1984**, *62*, 2229–2236. [[CrossRef](#)]
48. Leyton, A.; Pezoa-conte, R.; Barriga, A.; Buschmann, A.H.; Maki-Arvela, P.; Mikkola, J.-P.; Linqueo, M.E. Identification and efficient extraction method of phlorotannins from the brown seaweed *Macrocystis pyrifera* using an orthogonal experimental design. *Algal Res.* **2016**, *16*, 201–208. [[CrossRef](#)]
49. Hay, C.H. The distribution of *Macrocystis* (phaeophyta: Laminariales) as a biological indicator of cool sea surface temperature, with special reference to new Zealand waters. *J. R. Soc. N. Z.* **1990**, *20*, 313–336. [[CrossRef](#)]
50. Cassani, L.; Lourenço-Lopes, C.; Barral-Martinez, M.; Chamorro, F.; Garcia-Perez, P.; Simal-Gandara, J.; Prieto, M.A. Thermochemical characterization of eight seaweed species and evaluation of their potential use as an alternative for biofuel production and source of bioactive compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2355. [[CrossRef](#)]
51. Chkhikvishvili, I.D.; Ramazanov, Z.M. Phenolic substances of brown algae and their antioxidant activity. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2000**, *36*, 289–291. [[CrossRef](#)]
52. Generalić Mekinić, I.; Skroza, D.; Simat, V.; Hamed, I.; Čagalj, M.; Popović Perković, Z. Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification. *Biomolecules* **2019**, *9*, 244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ahmad, M.S.; Mehmood, M.A.; Al Ayed, O.S.; Ye, G.; Luo, H.; Ibrahim, M.; Rashid, U.; Nehdi, I.A.; Qadir, G. Kinetic analyses and pyrolytic behavior of Para grass (*Urochloa mutica*) for its bioenergy potential. *Bioresour. Technol.* **2017**, *224*, 708–713. [[CrossRef](#)]
54. Suutari, M.; Leskinen, E.; Fagerstedt, K.; Kuparinen, J.; Kuuppo, P.; Blomster, J. Macroalgae in biofuel production. *Phycol. Res.* **2015**, *63*, 1–18. [[CrossRef](#)]
55. Xia, A.; Jacob, A.; Herrmann, C. Production of hydrogen, ethanol and volatile fatty acids from the seaweed carbohydrate mannitol. *Bioresour. Technol.* **2015**, *193*, 488–497. [[CrossRef](#)]
56. Thompson, T.M.; Young, B.; Baroutian, S. Advances in the pretreatment of brown macroalgae for biogas production. *Fuel Proc. Technol.* **2019**, *195*, 106151. [[CrossRef](#)]
57. Hou, X.; Hansen, J.H.; Bjerre, A. Integrated bioethanol and protein production from brown seaweed *Laminaria digitata*. *Bioresour. Technol.* **2015**, *197*, 310–317. [[CrossRef](#)]
58. Mayala, T.S.; Ngavouka, M.D.N.; Douma, D.H.; Hammerton, J.M.; Ross, A.B.; Brown, A.E.; M’Passi-Mabiala, B.; Lovett, J.C. Characterisation of Congolese Aquatic Biomass and Their Potential as a Source of Bioenergy. *Biomass* **2022**, *2*, 1–13. [[CrossRef](#)]
59. Montingelli, M.E.; Tedesco, S.; Olabi, A.G. Biogas production from algal biomass: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *43*, 961–972. [[CrossRef](#)]
60. Bae, Y.; Ryu, C.; Jeon, J. The characteristics of bio-oil produced from the pyrolysis of three marine macroalgae. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 3512–3520. [[CrossRef](#)]
61. Balina, K.; Romagnoli, F.; Blumberga, D. Chemical composition and potential use of *Fucus vesiculosus* from Gulf of Riga. *Energy Procedia* **2016**, *95*, 43–49. [[CrossRef](#)]
62. Milla, S.; Elina, L.; Kurt, F.; Jorma, K.; Pirjo, K.; Jaanika, B. Macroalgae in biofuel production. *Phycol. Res.* **2014**. [[CrossRef](#)]
63. Chen, X.; Zhai, R.; Li, Y. Understanding the structural characteristics of water-soluble phenolic compounds from four pretreatments of corn stover and their inhibitory effects on enzymatic hydrolysis and fermentation. *Biotechnol. Biofuels* **2020**, *13*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Obata, O.; Akunna, J.; Bockhorn, H. Ethanol production from brown seaweed using non-conventional yeasts. *Bioethanol* **2016**, *2*, 134–145. [[CrossRef](#)]
65. Bonanno, G.; Orlando-bonaca, M. Chemical elements in Mediterranean macroalgae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *148*, 44–71. [[CrossRef](#)]
66. Ozgun, S.; Turan, F. Biochemical composition of some brown algae from Iskenderun bay, the northeastern Mediterranean coast of turkey. *J. Blac Sea Mediterr. Environ.* **2015**, *21*, 125–134.
67. Manev, Z.; Iliev, A.; Vachkova, V. Chemical characterization of brown seaweed—*Cystoseira barbata*. *Bulg. J. Agric. Sci.* **2013**, *19*, 12–15.
68. Mutripah, S.; Meinita, m.; Kang, J. Bioethanol production from the hydrolysate of *Palmaria palmata* using sulfuric acid and fermentation with brewer’s yeast. *J. Appl. Phycol.* **2014**, *26*, 687–693. [[CrossRef](#)]
69. Raval, M.C.; Sharma, S.; Gimpel, J. The role of alginate lyases in the enzymatic saccharification of brown macroalgae, *Macrocystis pyrifera* and *Saccharina latissima*. *Algal Res.* **2017**, *26*, 287–293. [[CrossRef](#)]

70. Offei, F.; Mensah, M.; Thygesen, A. Seaweed bioethanol production: A process selection review on hydrolysis and fermentation. *Fermentation* **2018**, *4*, 99. [[CrossRef](#)]
71. Khambhaty, Y.; Upadhyay, D.; Kriplani, Y. Bioethanol from macroalgal biomass: Utilization of marine yeast for production of the same. *BioEnergy Res.* **2013**, *6*, 188–195. [[CrossRef](#)]
72. Ra, C.H.; Kim, S.K. Optimization of pretreatment conditions and use of a two-stage fermentation process for the production of ethanol from seaweed, *Saccharina japonica*. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **2013**, *18*, 715–720. [[CrossRef](#)]
73. Olofsson, K.; Bertilsson, M.; Lidén, G. A short review on SSF—An interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol. Biofuels* **2008**, *1*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Abdel-Fattah, A.F.; Hussein, M.M. Composition of some brown algae as influenced by seasonal variation. *Phytochemistry* **1970**, *9*, 721–724. [[CrossRef](#)]
75. Khalid, A.; Aslam, M.; Qyyum, M.A.; Faisal, A.; Khan, A.L.; Ahmed, F.; Lee, M.; Kim, J.; Jang, N.; Chang, I.S.; et al. Membrane separation processes for dehydration of bioethanol from fermentation broths: Recent developments, challenges, and prospects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2019**, *105*, 427–443. [[CrossRef](#)]
76. Maneein, S.; Milledge, J.J.; Nielsen, B.V.; Harvey, P.J. A review of seaweed pre-treatment methods for enhanced biofuel production by anaerobic digestion or fermentation. *Fermentation* **2018**, *4*, 100. [[CrossRef](#)]
77. Fasahati, P.; Liu, J.J. Process simulation of bioethanol production from brown algae. *IFAC Proceed. Vol.* **2012**, *45*, 597–602. [[CrossRef](#)]
78. Popper, Z.A.; Ralet, M.C.; Domozych, D.S. Plant and algal cell walls: Diversity and functionality. *Ann. Bot.* **2014**, *114*, 1043–1048. [[CrossRef](#)]
79. Noblecourt, A.; Christophe, G.; Larroche, C. Hydrogen production by dark fermentation from pre-fermented depackaging food wastes. *Bioresour. Technol.* **2018**, *247*, 864–870. [[CrossRef](#)]
80. Liu, H.; Wang, G. Fermentative hydrogen production from macro-algae *Laminaria japonica* using anaerobic mixed bacteria. *Int. J. Hydrog. Energy* **2014**, *39*, 9012–9017. [[CrossRef](#)]
81. Song, M.; Pham, H.D.; Seon, J. Marine brown algae: A conundrum answer for sustainable biofuels production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *50*, 782–792. [[CrossRef](#)]
82. Jeliani, Z.Z.; Fazelian, N.; Yousefzadi, M. Introduction of macroalgae as a source of biodiesel in Iran: Analysis of total lipid content, fatty acid and biodiesel indices. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **2021**, *101*, 527–534. [[CrossRef](#)]
83. Fei, Q.; Chang, H.N.; Shang, L. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 2695–2701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

DISCUSSION GÉNÉRALE

I. CARACTÉRISATION STRUCTURALE ET PHYSICO-CHIMIQUES DES FUCOIDANES ET DES ALGINATES EXTRAITS DE LA MACRO-ALGUE BRUNE *H. scoparia* ET EVALUATION DE LEURS PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE

Les thalles d'*H. scoparia* ont été collectés au niveau des côtes de la ville de Tabarka-Tunisie (36° 57' 36.223" N and 8° 45' 12.018" E) durant le mois de février 2020. L'examen macroscopique a montré qu'il s'agissait de macroalgues composées par des touffes compactes de filaments brun foncé, volumineuses et rêches. Leurs morphologies ressemblaient à un balai de branchages. Cette identification morphologique a été suivie d'une identification moléculaire. Une étude *in silico* a été menée et nous a permis de sélectionner différents locus des gènes codant pour l'ARN 18S, LSUr Dna, Rbcl comme marqueurs moléculaires. L'ADN génomique de la macroalgue a été extrait et a fait l'objet de l'amplification, le clonage et le séquençage des régions en question. L'analyse des séquences obtenues a montré que la macroalgue était affiliée au genre *Halopteris* et à l'espèce *scoparia*. En parallèle, les séquences obtenues et celles des souches de référence ont été utilisées pour construire des arbres de similarité à l'aide du logiciel Mega 6 (version 6.0). En ce qui concerne les résultats de reconstruction de l'arbre phylogénétique basés sur le marqueur 18 S (Figure 69), *H. scoparia* est apparentée à *H. filicina*, avec une valeur de bootstrap de 89%. De plus, les résultats de la reconstruction de l'arbre phylogénétique basés sur le marqueur LSU ont montré que *H. scoparia* est lié à *Halopteris pseudospicata* avec un score bootstrap de 80%. Enfin, les résultats de la reconstruction de l'arbre phylogénétique basé sur le marqueur Rbcl ont prouvé que *H. scoparia* est étroitement lié à *H. filicina* avec une valeur de bootstrap de 98%. *H. scoparia* semble être incorporée sur l'arbre phylogénétique, indiquant qu'il est génétiquement proche de *H. filicina* et homologue à d'autres genres *Halopteris* déterminés par NCBI-BLAST et qu'il partage différents traits morphologiques. Dans l'ensemble, l'application de codes-barres ADN utilisant les marqueurs 18S, LSU et rbcl a permis d'identifier avec succès la macroalgue *H. scoparia*, récoltée à Tabarka. Ces trois marqueurs étaient suffisants pour distinguer avec précision *H. scoparia* des autres espèces (par exemple *H. filicina*). Notons que ces données ont été déposées dans la base de données NCBI, GenBank (OK646025.1 et OK646131.1).

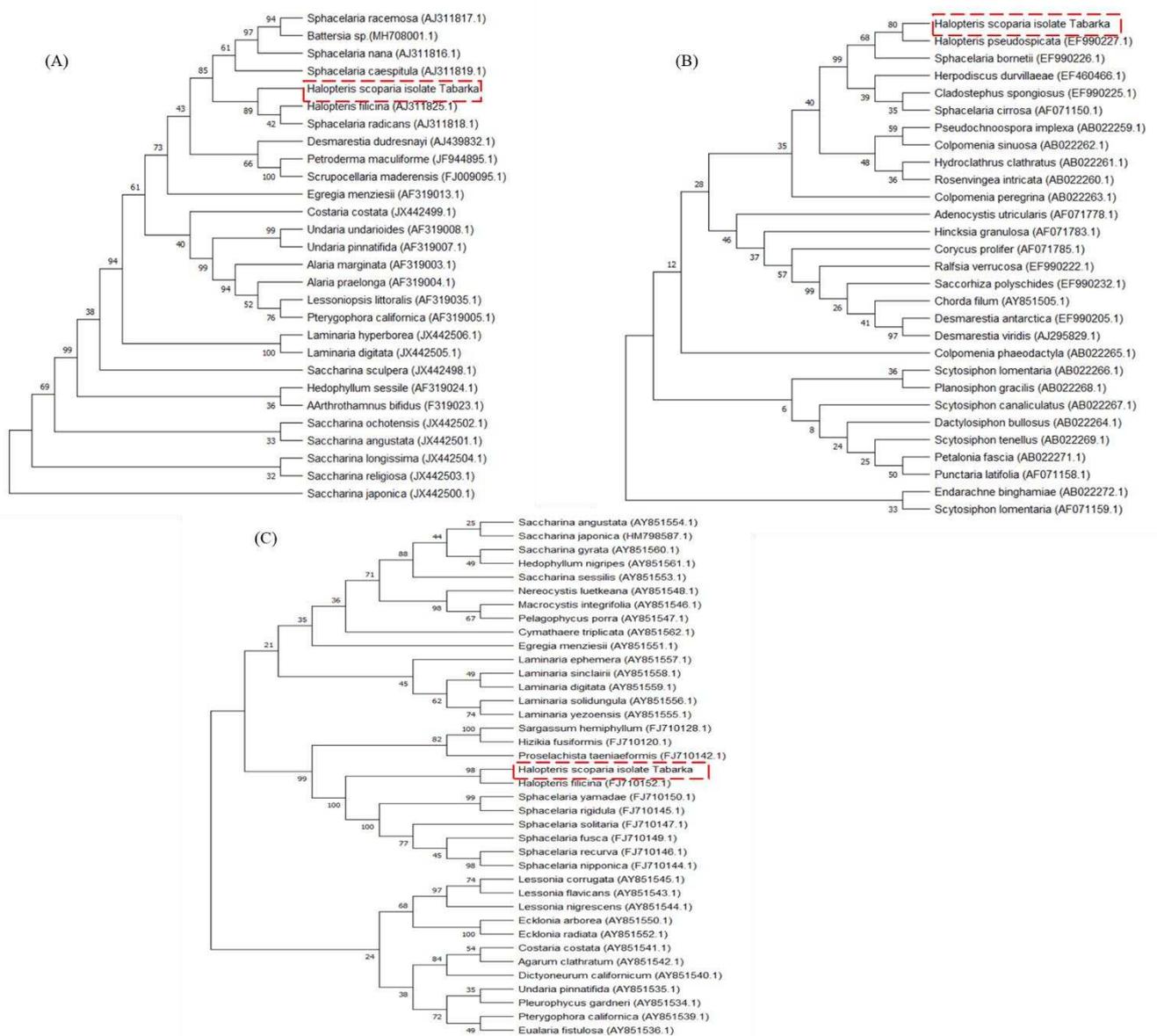


Figure 69. Arbre phylogénétique d'*H. scoparia* basé sur les séquences des marqueurs 18S (A), LSU (B) et RbcL (C).

Comme d'autres macroalgues appartenant aux *Phaeophyceae*, *H. scoparia* est caractérisée par sa richesse en biomolécules dont les composés phénoliques, les terpénoïdes, les pigments, les vitamines, les phlorotannins, les alcaloïdes, les tocophérols, les protéines et les glucides ou polysaccharides, pouvant présenter des intérêts biotechnologiques (Ul-Haq et al., 2019). Ces composés bioactifs présentent de nombreuses propriétés, e.g. anticoagulante, immunomodulatrice, anticancéreuse, antitumorale, antioxydante, anti-allergène, anti-inflammatoire, hypoglycémiant, anti-obésité, antimicrobienne, antifongique ou encore antivirale (Hentati et al., 2020).

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'extraction et à la caractérisation structurale des polysaccharides (FHS et AHS) et de certains pigments (P-FX et P-CT) extractibles de la macroalgue *H. scoparia*. Nous avons également étudié leurs propriétés physico-chimiques et leurs activités biologiques de ces molécules à travers un screening assez large, basés sur les données d'intérêt décrites dans la littérature et le contexte macro-économique Tunisien concernant la valorisation de macroalgues.

I.1. Extraction et caractérisation des polysaccharides extraits d'*H. scoparia*

Le premier volet de cette étude consiste en l'extraction des polysaccharides d'*H. scoparia*, à savoir les fucoïdanes et les alginates, et l'étude de leurs compositions biochimiques, leurs caractéristiques structurales, leurs propriétés rhéologiques ainsi que leurs activités biologiques. Il a été rapporté que les macroalgues marines peuvent être une source de divers polysaccharides (Gupta et Abu-Ghannam, 2011). Celles affiliées à la lignée brune telle que *Hizikia fusiformis*, *F. vesiculosus* et *U. pinnatifida*, sont connues par leurs richesses. Ainsi, nous avons procédé à l'extraction des fucoïdanes (FHS) à partir d'*H. scoparia*. Le rendement de l'extraction est de l'ordre de 1,6% (m/m). Le **rendement en fucoïdanes** obtenu est proche de celui rapporté pour la macroalgue *Turbinaria decurrens* soit **1,28%** (Anisha et al., 2022). Cependant, ce rendement est plus faible que ceux de *Nizamuddinia zanardinii* (3,51%), *Sargassum myriocystum* (6,2%) et *Sargassum ilicifolium* (6%) (Anisha et al., 2022). La richesse des macroalgues en fucoïdanes est très variable allant de 0,71% chez *S. japonica* jusqu'à 25,99% chez *F. vesiculosus*. Cette variation des rendements d'extraction est due à des facteurs intrinsèques en relation avec l'espèce macroalgale et son cycle de reproduction ainsi qu'aux conditions abiotiques la saison et la localisation géographique du site de la récolte (Rioux et al., 2007). Outre ces facteurs, Anisha et al. (2022) ont montré que différents paramètres d'extraction, tels que la température, la pression, la durée, la nature et la proportions en solvant influent leurs rendements d'extraction. Getachew et al. (2022) ont montré que l'extraction des polysaccharides sous haute pression et température est une technique très efficace pour l'extraction des fucoïdanes à partir de la biomasse algale. En fait, les températures et les pressions élevés perturbent les liaisons hydrogènes, les forces de Van der Waals et les interactions dipolaires des constituants des parois cellulaires et améliorent la diffusion du solvant d'extraction dans la matrice et la dissolution des polysaccharides, augmentant ainsi les rendements d'extraction.

Les fucoïdanes ainsi extraits ont été caractérisés biochimiquement. Les résultats obtenus ont montré que la fraction FHS présente **un taux élevé de sucres totaux** (78,87%), renfermant majoritairement des oses neutres (64,35%), des acides uronique (9,72%), des **groupements sulfate** (7,26%) et des traces des polyphénols et de protéines (1,24% et 0,26%, respectivement). En comparaison avec des données bibliographiques, cette composition est analogue à celle des fucoïdanes extraits de *Sargassum ilicifolium* en termes de sucres totaux (Tsou et al., 2022) mais assez divergente d'autres dont des fucoïdanes commercialisés et d'autres extraits de *S. wightii*, *Sargassum swartzii*, *Turbinaria ornata*, *Cystoseira compressa* (Puhari et al., 2022 ; Hentati et al., 2018). L'analyse de FHS par IRTF a montré une faible absorbance à 1631 cm^{-1} confirmant la faible concentration en acides uroniques. Des signaux en 465 cm^{-1} , 579 cm^{-1} , 825 cm^{-1} , 1029 cm^{-1} et 1223 cm^{-1} indiquent la **présence de groupements sulfate** (Hentati et al., 2018). La composition en monosaccharides de FHS a été déterminée par GC-MS. Les résultats obtenus ont montré que cette fraction est composée de **45% de fucose**, 18% galactose, 14% acide galacturonique, 12% xylose, 10% arabinose et 1% rhamnose. Le **ratio Fuc/Gal** a été ainsi déterminé (**2,4**), valeur comparable aux ratios rapportés pour des fucoïdanes extraits de *C. compressa* (Hentati et al., 2018), *A. cribrosum* (Cho et al., 2014 ; Prokofjeva et al., 2013) et de *S. vulgare* (Dore et al., 2013). Par ailleurs, une analyse des liaisons glycosidiques a été menée par spectroscopie RMN. Les spectres obtenus ont révélé des signaux à 1,7, 4,26 et 4,7 ppm suggérant la présence de résidus **(1,3)- α -L-Fucp-(2,4 di-O-SO₃⁻)** et **(1,4)- α -L-Fucp** (Bilan et al., 2002 ; Adhikari et al., 2006).

La masse molaire en nombre (Mn) et celle en poids (Mw) de FHS ont été déterminées par SEC/MALS, soit $8,14 \times 10^5\text{ g/mol}$ et **$2,76 \times 10^5\text{ g/mol}$** , respectivement. La viscosité $[\eta]$ de FHS a été aussi obtenue, soit **764 mL/g**. Cette valeur de viscosité est en accord avec celles caractérisant des fucoïdanes extraits d'algues brunes dont *C. trinode*, *S. latifolium*, et *C. myrica* (Larsen et al., 2003). Une estimation de la concentration critique de recouvrement (C^*) permet d'évaluer la **C^* théorique entre 1,0 et 5,2 g/L** selon le calcul $0,8-4/[\eta]$, les valeurs 0,8-4 étant étroitement liées à la conformation en solution du PS (Castelain et al., 1987 ; Lapasin et al., 1999). Notons que **les propriétés rhéologiques de la fraction FHS n'ont pas été étudiées**, les fucoïdanes étant connues pour leur comportement à l'écoulement très limité, proches de liquides newtoniens.

Les **alginates** (AHS) représentent la seconde famille de polysaccharides matriciels étudiée dans ce travail. Ils ont été extraits à partir de biomasse d'*H. scoparia*, avec un **rendement d'extraction de 12%** (m/m). Les rendements d'extraction des alginates à partir d'algues brunes sont très variables. En effet, le rendement obtenu est comparable à celui

rapporté pour le genre *Sargassum* (Sellimi et al., 2015 ; Hadj Ammar et al., 2016). Les rendements sont en général plus importants après un traitement alcalin, par exemple pour *Padina australis*, *P. perindusiata* et *D. caribaea* avec des valeurs de 5,89%, 5,4% et 7,5%, respectivement (Benslima et al., 2021). En conditions alcalines, les rendements d'extraction sont donc assez élevés à l'exemple de ceux rapportés pour *P. boergesenii*, *L. trabeculata*, *D. antarctica* et *E. cava* avec des rendements de 24, 25%, 25,67%, 53% et 38% respectivement (Permatasari et al., 2022). Le rendement d'extraction des alginates dépend ainsi énormément du type de la macroalgue, le lieu et la saison de la récolte ainsi que du procédé d'extraction (Sellimi et al., 2015). Par ailleurs, Rahelivao et al. (2013) ont montré que la présence d'EDTA améliore le rendement d'extraction des alginates d'environ 30%.

La composition biochimique des alginates extraits d'*H. scoparia* (AHS) a été déterminée. AHS présente une teneur en **sucres totaux de 67,04%**. Les **acides uroniques** étaient **majoritaires** avec un taux de 53,01% associés à de faibles quantités de protéines (1,40%) et des traces de polyphénols (soit 0,01 %). Ces résultats sont en concordance avec la composition des alginates extraits de *F. spiralis* et *B. bifurcata* (Bouissil et al., 2020). Un niveau élevé d'acides uroniques a été préalablement décrit pour les alginates de *C. compressa* et *C. barbata* (Sellimi et al., 2015 ; Hentati et al., 2020). De plus, les analyses colorimétriques de AHS ont révélé la présence de sucres neutres (20,05%) et des traces de sulfate (5,96%) qui peuvent correspondre à une **contamination par des fucoïdanes** dues à la coextraction (Bouissil et al., 2020).

L'analyse de AHS par IRTF a révélée la présence d'une large bande centrée à 3326 cm^{-1} attribuée aux vibrations d'étirement O-H liées à l'hydrogène et un signal faible à 2937,1 cm^{-1} attribué aux vibrations d'étirement C-H (Benaoun et al., 2017). Le spectre a aussi montré la présence de bandes à 1605 cm^{-1} attribuées aux vibrations symétriques d'étirement des **groupements carboxylate** (COO^-) sur le squelette polymérique de l'alginate et la bande à 1410 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'élongation asymétrique O-C-O. Ce spectre est similaire à celui de l'alginate de sodium commercial (Alfa Aesar). La région anomérique du spectre de AHS (878-800 cm^{-1}) montre des bandes d'absorption caractéristiques des acides uroniques (Chandia et al., 2001). Les pics correspondants aux 1027 et 1038 cm^{-1} pourraient être respectivement attribués à GulA et ManA, permettant ainsi l'estimation d'un rapport M/G < 1 (Fenoradosoa et al., 2010). Une **estimation du rapport M/G** de AHS a été proposée, à savoir un **M/G < 1**, indiquant que AHS est majoritairement composé de GulA. Ce rapport M/G est en concordance avec ceux précédemment décrits pour les alginates extraits de *C. compressa*, *C. trinode*, *L. hyperborea*, *C. myrica*. D'après des données bibliographiques, un alginate ayant un

rapport M/G < 1 forme des **gels rigides** en raison du faible taux de ManA (Abka-Khajouei et al., 2022).

L'analyse des AHS par **RMN-¹H** a révélé la présence de **trois assignations majeures**, nommées HG-1, HM-1+HGM-5 et HG (GG-5G) -5 à 5,53 ppm, 5,13 ppm et 4,92 ppm, respectivement. Ces signaux sont typiques des alginates (Torres et al., 2007 ; Khajouei et al., 2018). Le **ratio M/G**, calculé précisément, est bien inférieur à 1 et **de l'ordre de 0,35**. AHS se compose donc de **26% de ManA** et **74% de GULA**. Ces résultats sont en parfaite concordance avec ceux issus de l'analyse IRTF. Des études antérieures ont montré que les alginates de sodium extraits de *L. digitata*, *D. antarctica* et *L. japonica* présentent un rapport M/G de l'ordre de 1,12, 3 et 1,86, respectivement. Mais en comparaison avec d'autres espèces, le rapport M/G extrait de *H. scoparia* est plus élevé que ceux déterminés pour des alginates extraits de *C. myrica*, *C. trinode* et *C. barbata*, avec des rapports M/G de 0,45, 0,59 et 0,59, respectivement (Larsen et al., 2003 ; Sellimi et al., 2015). Ce résultat présage la capacité de la fraction AHS a formé des **gels rigides**.

L'analyse SEC/MALS a révélé que AHS présente une masse molaire moyenne en nombre (Mn) de $1,14 \times 10^5$ g/mol et une masse molaire moyenne en poids (Mw) de **$5,52 \times 10^5$ g/mol**. Cette valeur de Mw est proche de celle rapportée pour les alginates extraits de *S. turbinarioi* ($5,528 \times 10^5$ g/mol). Toutefois, des valeurs de Mw plus faibles ont été décrites, par exemple pour des alginates extraits de *C. sedoide* et *F. vesiculosus*, i.e. $1,4 \times 10^5$ et $1,17 \times 10^5$ g/mol, respectivement (Fourest et al., 1997). La **viscosité intrinsèque $[\eta]$** de AHS, de **318 mL/g**, est en concordance avec celle des alginates extraits de *Hormophysa* sp. (392 mL/g). Cette viscosité se situe dans la moyenne de celles décrites dans la littérature pour les alginates (Larsen et al., 2003 ; Sellimi et al., 2015). Notons qu'une estimation de la C* (comme précédemment) permet d'évaluer cette concentration entre 2,5 et 12,5 g/L. Ces valeurs traduisent un comportement peu viscosant, **sans ajout d'ions cationiques** (CaCl₂).

I.2. Activités biologiques des fucoïdanes (FHS) et des alginates (AHS)

Comme très largement explicité dans la partie bibliographie, les fucoïdanes et alginates présentent un potentiel de propriétés physico-chimiques et d'activités biologiques extrêmement riche et varié. Les **Tableaux 9 et 10** dressent une synthèse, relativement exhaustive, de données décrites dans la littérature, complétées par des données obtenues au cours de ces travaux de thèse.

Tableau 9. Activités biologiques des fucoïdanes en comparaison avec notre étude.

Activités		CI ₅₀ (mg/mL)				Fucoïdanes (%)			
		Acide ascorbique (mg/mL)	Valeurs (mg/mL)	Macroalgues	Références	Acide ascorbique (%)	Valeurs (%)	Macroalgues	Références
Anti-oxydantes	Anti-radicalaire	0,2	<ul style="list-style-type: none"> 1,1 4,5 2 2,45 1,20 1,15 0,035 	<ul style="list-style-type: none"> <i>H. scoparia</i> <i>K. crassifolia</i> <i>S. binderi</i> <i>F. versiculosus</i> <i>C. okamuranus</i> <i>N. decipiens</i> <i>A. nodosum</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Notre étude Ajisaka et al., 2016 Chattopadhyay et al., 2010 Ajisaka et al., 2016 Ajisaka et al., 2016 Ajisaka et al., 2016 Yuan et al., 2015 	100	<ul style="list-style-type: none"> 76,66 90 22,5 < 77 < 19,1 < 30,4 70 40 15 	<ul style="list-style-type: none"> <i>H. scoparia</i> <i>C. compressa</i> <i>S. vulgare</i> <i>C. sedoides</i> <i>S. pallidum</i> <i>A. nodosum</i> <i>T. conoides</i> <i>K. crassifolia</i> <i>L. fusiforme</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Notre étude Hentati et al., 2018 Sellimi et al., 2014 Hadj Ammar et al., 2016 Ye et al., 2008 Yuan et al., 2015 Chattopadhyay et al., 2010 Chattopadhyay et al., 2010 Wang et al., 2019
	Chélation des ions ferreux	0,2	<ul style="list-style-type: none"> 1 0,65 	<ul style="list-style-type: none"> <i>H. scoparia</i> <i>S. glaucescens</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Notre étude Huang et al., 2016 	99,31	<ul style="list-style-type: none"> 76 45 42 7 11 9 30 20 29,12 	<ul style="list-style-type: none"> <i>H. scoparia</i> <i>D. mertensis</i> <i>C. caudata</i> <i>C. isthmocladum</i> <i>S. filipendula</i> <i>S. schroederi</i> <i>C. cervicornis</i> <i>C. sedoides</i> <i>L. japonica</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Notre étude Costa et al., 2010 Costa et al., 2010 Costa et al., 2010 Costa et al., 2010 Costa et al., 2010 Costa et al., 2010 Camara et al., 2011 Hadj Ammar et al., 2016 Wang et al., 2008
	Activité réductrice de fer	2,5	<ul style="list-style-type: none"> 0,135 0,12 0,4 0,3 0,182 0,04 à 1,59 0,4 0,197 0,35 	<ul style="list-style-type: none"> <i>H. scoparia</i> <i>L. japonica</i> <i>S. glaucescens</i> <i>C. sedoides</i> <i>N. zanardinii</i> <i>Sargassum</i> sp <i>S. tenerrimum</i> <i>S. cristaefolium</i> <i>C. submersum</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Notre étude Wang et al., 2008 Wang et al., 2008 Hadj Ammar et al., 2016 Alboofetileh et al., 2019 Hifney et al., 2016 Flórez-Fernández et al., 2020 Manlusoc et al., 2019 Hoang et al., 2007 				
		Piégeage des radicaux superoxydes anions					100	<ul style="list-style-type: none"> 13,94 8,9 à 15,4 10,72 61 	<ul style="list-style-type: none"> <i>H. scoparia</i> <i>S. polycystum</i>, <i>T. ornata</i> et <i>P. boryana</i> <i>Sargassum</i> sp. <i>S. binderi</i>
	Piégeage des radicaux hydroxyles					100	<ul style="list-style-type: none"> 64 53,4 à 56,5 20,8 50 10 	<ul style="list-style-type: none"> <i>H. scoparia</i> <i>S. polycystum</i>, <i>T. ornata</i> et <i>P. boryana</i> <i>S. fusiform</i> <i>C. costata</i> <i>L. japonica</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Notre étude Fauziee et al., 2021 Ma et al., 2017 Wang et al., 2014 Wang et al., 2009
Anti-inflammatoire	Inhibition de dénaturation de BSA	Diclofénac (3 mg/mL)	<ul style="list-style-type: none"> 1 3 0,75 1,9 1,6 1,4 60 µg/mL 	<ul style="list-style-type: none"> <i>H. scoparia</i> <i>F. serratus</i> <i>F. vesiculosus</i> <i>S. japonica</i> <i>F. distichus</i> <i>A. nodosum</i> <i>S. wightii</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Notre étude Obluchinskaya et al., 2022 Obluchinskaya et al., 2022 Obluchinskaya et al., 2022 Obluchinskaya et al., 2022 Obluchinskaya et al., 2022 Obluchinskaya et al., 2022 Sonia et al., 2021 	Diclofénac (35%)			
Anti-diabétique	α-amylase		<ul style="list-style-type: none"> 0,04 4,64 	<ul style="list-style-type: none"> <i>H. scoparia</i> <i>A. nodosum</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Notre étude Kim et al., 2014 				

			<ul style="list-style-type: none"> • 49 µg/mL • 0,19 • 40 µg/mL • 0,980 • 0,9 • 0,137 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>F. vesiculosus</i> • <i>U. pinnatifida</i> • <i>G. opuntia</i> • <i>P. tetrastromatica</i> • <i>S. wightii</i> • <i>U. Pinnatifida</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Kim et al., 2014 • Koh et al., 2020 • Makkar et al., 2017 • Antony et al., 2022 • Zayed et al., 2022 • Zeng et al., 2022 	
Anti-virale	Natif	Zovirax (0,39 µg/mL)	<ul style="list-style-type: none"> • 19,44 µg/mL • 32 µg/mL • 0,89 µL/mL • 0,33 à 0,7 g/mL <ul style="list-style-type: none"> • 1,56 à 6,25 • 0,5 à 1 µg/mL <ul style="list-style-type: none"> • 0,6 et 0,9 µg/mL • 250 µg/mL • 50-500 µg/ mL • 0,001 à 100 µg/mL <ul style="list-style-type: none"> • 0,33 à 0,7 µg mL <ul style="list-style-type: none"> • 1,56 à 6,25 µg/mL • 0,76-1,34 µg/mL • 0,25-250 µg/ mL 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>H. scoparia</i> • <i>U. pinnatifida</i> • <i>S. henslowianum</i> • <i>S. mcclurei</i>, <i>S. polycystum</i> et <i>T. ornate</i> • <i>S. swartzii</i> • <i>D. mertensii</i>, <i>L. variegata</i>, <i>F. vesiculosus</i> et <i>S. schroederi</i> • <i>A. utricularis</i> • <i>K. crassifolia</i> • <i>L. japonica</i> • <i>S. cichorioides</i>, <i>S. japonica</i> • <i>S. mcclurei</i>, <i>S. polycystum</i> et <i>T. ornate</i> • <i>S. swartzii</i> • <i>S. lomentaria</i> • <i>F. evanescens</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Notre étude • Bedoux et al., 2017 • Sun et al., 2019 • Luthuli et al., 2019 <ul style="list-style-type: none"> • Wei et al., 2022 • Queiroz et al., 2008 <ul style="list-style-type: none"> • Lomartire et al., 2022 • Oliyaei et al., 2022 • Prokofjeva et al., 2013 • Prokofjeva et al., 2013 <ul style="list-style-type: none"> • Dinesh et al., 2016 <ul style="list-style-type: none"> • Dinesh et al., 2016 • Oliyaei et al., 2022 • Oliyaei et al., 2022 	
		Hydrolysé		<ul style="list-style-type: none"> • 27,84 µg/mL • 100 µg/mL 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>H. scoparia</i> • <i>F. evanescens</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Notre étude • Krylova et al., 2020
Cytotoxique HSV-1	Natif		<ul style="list-style-type: none"> • < 200 µg/ml • 0,33 à 0,7 g/mL <ul style="list-style-type: none"> • 1 000 µg /mL 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>H. scoparia</i> • <i>S. mcclurei</i>, <i>S. polycystum</i> et <i>T. ornata</i> • <i>S. swartzii</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Notre étude • Pradhan et al., 2022 <ul style="list-style-type: none"> • Dinesh et al., 2016 	

Tableau 10. Activités biologiques des alginate en comparaison avec notre étude.

Activités	CI ₅₀ (mg/mL)			Alginates	Acide ascorbique (%)	Autres activités (%)
	AHS	Acide Ascorbique				
Antioxydantes	Anti-radicalaire	-	0,2	-	100	<ul style="list-style-type: none"> • 35,8 • 70 • 40 • 75 • 43 • 20.10 • 11,89 <ul style="list-style-type: none"> • <i>H. scoparia</i> • <i>C. compressa</i> • <i>T. conoides</i> • <i>C. barbata</i> • <i>C. peregrina</i> • <i>Sargassum</i> sp. • Alginate commercial <ul style="list-style-type: none"> • Notre étude • Hentati et al., 2018 • Chattopadhyay et al., 2010 • Sellimi et al., 2014 • Rostami et al., 2017 • Lim et al., 2017 • Lim et al., 2017
	Chélation des ions ferreux	0,2	-	<ul style="list-style-type: none"> • 0,2 • 0,3 • 10 • 0,3 • 1 • 20 mg/mL (présente 20%) <ul style="list-style-type: none"> • <i>H. scoparia</i> • <i>C. compressa</i> • <i>C. sedoides</i> • <i>S. latifolium</i> • <i>S. lomentaria</i> • Alginate (Grindsted" Alginate FD 170) <ul style="list-style-type: none"> • Notre étude • Hentati et al., 2018 • Hadj Ammar et al., 2016 • Fawzy et al., 2021 • Kuda et al., 2005 • Falkeborg et al., 2014 	99,31	
	Activité réductrice de Fer	0,89	-	<ul style="list-style-type: none"> • 0,89 • 1,9 à 1 mg/mL • 0,7 à 0,5 • 0,09 à 0,23 • 0,1 <ul style="list-style-type: none"> • <i>H. scoparia</i> • <i>C. compressa</i> • <i>C. barbata</i> • <i>S. latifolium</i> • Sodium alginate (Lot no. S26286) <ul style="list-style-type: none"> • Notre étude • Hentati et al., 2018 • Sellimi et al., 2015 • Fawzy et al., 2017 • Zhang et al., 2020 		
	Piégeage des anions superoxydes				100	<ul style="list-style-type: none"> • 11,22 • 16, 3 à 19,8 • 0 <ul style="list-style-type: none"> • <i>H. scoparia</i> • <i>S. polycystum</i>, <i>T. ornata</i> et <i>P. boryana</i> • Sodium alginate (Grindsted® Alginate FD 170) <ul style="list-style-type: none"> • Notre étude • Fauziee et al., 2021 • Falkeborg et al., 2014
	Piégeage des radicaux hydroxyles				100	<ul style="list-style-type: none"> • 100 • 80 • 30 • (82%) à 5 mg/mL • 65 <ul style="list-style-type: none"> • <i>H. scoparia</i> • <i>S. polycystum</i>, <i>T. ornata</i> et <i>P. boryana</i> • Alginate de sodium (Grindsted® Alginate FD 170) • <i>C. barbata</i> • <i>N. zanardini</i> <ul style="list-style-type: none"> • Notre étude • Fauziee et al., 2021 • Falkeborg et al., 2014 • Sellimi et al., 2015 • Khajouei et al., 2021
Anti-inflammatoire	Inhibition de dénaturation de BSA	1			35	<ul style="list-style-type: none"> • 85 • 62,19 • (35%) à 0,5mg/mL • (7%) à 50 mg/mL <ul style="list-style-type: none"> • <i>H. scoparia</i> • <i>T. conoides</i> • Acide alginique • Alginate de calcium <ul style="list-style-type: none"> • Notre étude • Kavitha et al., 2019 • Elbayomi et al., 2021 • Chen et al., 2017
Anti-diabétique	Alpha amylase	0,1		<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 • 0,103 • 0,075-0,103 • 75 µg/mL <ul style="list-style-type: none"> • <i>H. scoparia</i> • <i>U. pinnatifida</i> • <i>L. digitata</i> • <i>T. ornata</i> <ul style="list-style-type: none"> • Notre étude • Zheng et al., 2022 • Zaharudin et al., 2018 • Kaushik et al., 2023 		

I.2.1. Activités antioxydantes

Le stress oxydatif génère des ROS qui sont responsables de lésions tissulaires et de dommages cellulaires. Elles ciblent diverses macromolécules dont les acides nucléiques, les lipides et les protéines (Elboutachfaiti et al., 2011 ; Delattre et al., 2015). La plupart des organismes sont capables de se protéger contre les effets néfastes du stress oxydatif. En cas de stress oxydatif sévère, les mécanismes de défense innés n'assurent pas la protection du corps humain ce qui aboutit à l'accumulation de radicaux libres dérivés de l'oxygène tels que le radical superoxyde d'anion ou le radical hydroxyle accélérant les mécanismes de vieillissement et causant la carcinogenèse (Rahal et al., 2014). Ainsi, pour se protéger contre les dommages oxydatifs, des agents antioxydants peuvent être utilisés. Des molécules synthétiques telles que la tert-butylhydroquinone (TBHQ), l'hydroxyanisole butylée (BHA), le gallate de propyle (PG) et l'hydroxytoluène butylé (BHT) sont couramment utilisés (Qi et al., 2005). Néanmoins, ces composés chimiques (BHA, BHT et TBHQ) deviennent de plus en plus limités par la législation en raison de leur toxicité et de leur impact cancérigène. C'est pourquoi, la recherche d'antioxydants naturels tels que les polysaccharides, en alternatives à des antioxydants connus comme l'acide ascorbique ou les polyphénols, par exemple issus de macroalgues est en vogue. Dans ce contexte, nous avons évalué les potentiels anti-oxydants des fractions FHS et AHS (**Tableaux 9 et 10**). Gülçin et al. (2006) ont expliqué cette différence d'activité chélatrice par la présence de groupes fonctionnels, en particulier les groupements sulfates, leurs positions, et leur abondance. L'activité chélatante des alginates dépend des groupements fonctionnels, dont principalement les résidus ManA (Hassan et al., 2013). D'autres études ont révélé l'importance des liaisons *O*-glycosidiques telles que 1→2, 1→4 et 1→6 entre les monosaccharides de type rhamnose, mannose ou fucose (Wang et al., 2015). La masse molaire des polysaccharides et leur pureté jouent aussi un rôle déterminant dans cette activité (Hentati et al., 2018). En effet, Liu et al. (2021) ont montré que les polysaccharides de faibles masses molaires, et présentant donc plus d'extrémités terminales réductrices que les polysaccharides de hautes masses molaires, avaient une meilleure capacité à accepter et à éliminer les radicaux libres. Il a été rapporté qu'un PS de masse molaire de 55,0 kDa, obtenu après dégradation d'un polysaccharide extrait de *Pavlova viridis* de masse molaire de l'ordre de 3645 kDa, présentait une activité de piégeage de DPPH plus élevée bien alors que sa teneur en groupements sulfatés et sa composition en monosaccharides restaient identiques au polymère natif (Banerjee et al., 2018). Les activités de piégeage des alginates sont souvent corrélées avec leur caractère acide en raison de la présence des résidus GulU (Lim et al., 2014). Par ailleurs, les extraits d'alginate

présentent souvent des activités de piégeage d'•OH plus élevées que celles de fucoïdanes, souvent à cause de masses molaires plus importantes (Falkeborg et al. 2014).

I.2.2. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est un processus biologique complexe. Les radicaux libres sont connus pour être des médiateurs inflammatoires. Les métabolites réactifs de l'oxygène peuvent déclencher et/ou augmenter l'inflammation (Conner et al., 1996). L'inflammation est associée à un déséquilibre du système immunitaire suite à une perméabilité vasculaire accrue et à une dénaturation de plusieurs protéines (Alhakmani et al., 2013). La dénaturation des protéines favorise la formation d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoires, le cancer et le diabète (Dharmadeva et al., 2018). L'inhibition de la dénaturation des protéines peut réduire l'activité inflammatoire. La dénaturation des protéines est un processus complexe qui implique l'altération des liaisons électrostatiques hydrogène, des liaisons hydrophobes et des ponts disulfures (Sen et al., 2015). La chaleur a été utilisée afin de favoriser la dénaturation de l'albumine. Les fucoïdanes (**FHS**) et les alginates (**AHS**) se sont montrés capables d'inhiber la **dénaturation des protéines, i.e. la BSA** ou albumine avec des valeurs d'**CI₅₀ d'environ 1 mg/mL** par rapport au diclofénac (**Tableaux 9 et 10**). En se basant sur des données bibliographiques, la capacité des polysaccharides à inhiber la dénaturation des protéines est liée à leurs teneurs en fucose et à leurs taux de sulfatation. En ce qui concerne les alginates, les charges positives des groupements fonctionnels de la BSA (NH₃⁺) peuvent se lier aux groupements carboxyle de l'alginate par des liaisons électrostatiques et peuvent ainsi créer des complexes BSA/alginate, et conduire à l'inhibition de la dénaturation de la BSA.

I.2.3. Activité anticoagulante

Les activités anticoagulantes des fucoïdanes et des alginates extraits de *H. scoparia* ont été évaluées à l'aide des tests TCA (Temps de céphaline activé) et TP (Taux de prothrombine) en utilisant l'héparine comme témoin. Le test PTTa mesure le temps essentiel à la formation d'un caillot sanguin alors que le TP est une analyse effectuée pour déterminer la qualité de la coagulation du sang, essentiellement chez les sujets sous traitements anticoagulants. Le test APTT a été utilisé pour déterminer les effets des fucoïdanes (FHS) et des alginates (AHS) sur les facteurs intrinsèques II, V, VIII, IX, XI et XII et/ou les voies communes. La prolongation de l'APTT montre l'inhibition des facteurs intrinsèques et/ou des voies communes. En effet, la fraction **FHS** augmente le **temps de céphaline activé** de **61,7 s à 150 s** à des concentrations entre **0,625 et 10 mg/mL** alors que le **AHS** maintient un **temps de céphaline activé** de l'ordre

de 27 s à des concentrations entre **0,625 et 10 mg/mL** qui est similaire à celui de l'héparine. En plus, le temps de prothrombine (TP) est un test de la voie extrinsèque utilisé pour déterminer les effets des fucoïdanes (FHS) et des alginates (AHS) sur les facteurs V, VII et X, II. Les résultats obtenus ont montré que le **taux de prothrombine de FHS diminue de 100% à 0,625 mg/mL à 25,3%** à une concentration de **10 mg/mL**. En utilisant une concentration de 0,6 mg/mL à 10 mg/mL, le traitement avec le **AHS** est similaire à celui de l'héparine et présente un **taux de prothrombine** qui se maintient presque à **100%**.

Ces résultats suggèrent l'inhibition des facteurs intrinsèques et/ou des voies communes en utilisant la fraction FHS. En comparaison avec d'autres études, un fucoïdane extrait d'*U. pinnatifida* a montré un TCA prolongé plus faible et un taux de prothrombine plus faible que l'héparine (Min et al., 2012). Un galactane sulfaté extrait de *Codium cylindricum* a montré des activités anticoagulantes notables avec des valeurs d'APTT supérieures à 300 s à une concentration (15 µg/mL) (Matsubara et al., 2001). Karaki et al. (2013) a montré qu'un mélange de fucoïdane et mannuronane présentait un APTT de 40,8 s tandis qu'un mélange de fucoïdane, de laminarine et de mannuronane permettait d'obtenir un APTT de 43,4 s. En plus, Jin et al. (2013) ont suggéré que l'APTT (voie intrinsèque) pouvait dépendre du rapport Fuc/Gal ainsi que du poids moléculaire moyen. Le taux de prothrombine (voie extrinsèque) pourrait être influencée par la dose et la teneur en groupements sulfates mais aussi par les caractéristiques structurales des fucoïdanes, sans impliquer leur poids moléculaire (Trang et al., 2022). Au regard de la littérature, plusieurs études ont montré que les groupes sulfates ne peuvent pas augmenter le taux de prothrombine mais peuvent affecter les facteurs de coagulation dans la voie extrinsèque (Fan et al., 2011). Ces auteurs ont d'ailleurs montré que le degré de substitution et la masse molaire des alginates sont fortement liés à leur activité anticoagulante. Roberta et al. (1993) ont mis en évidence que la charge négative des groupes sulfates permettait de neutraliser la charge positive des résidus d'acides aminés dans l'antithrombine, améliorant l'activité anticoagulante par inhibition de l'activité des facteurs IIa et Xa. Xin et al. (2016) ont confirmé que le temps de coagulation augmente avec l'augmentation des masses molaires des alginates.

I.2.4. Activités antidiabétiques

Nous avons évalué l'activité d'inhibition de l' α -amylase de FHS et AHS (**Tableaux 9 et 10**).

L'activité inhibitrice de l' α -amylase s'est avérée plus forte avec l'extrait de fucoïdanes qu'avec les alginates. **FHS** a montré un pourcentage d'inhibition de l' α -amylase (**78,89%**) à **2 mg/mL**, plus élevé que l'inhibition par l'extrait d'alginate (**AHS**) (**70,64%**). La différence des pouvoirs d'inhibition entre les extraits peut s'expliquer par leurs structures. Houghton et al. (2015) ont rapporté que les alginates sont plus susceptibles d'être absorbés et peuvent former des gels acides et ioniques. Ces caractéristiques peuvent avoir un impact sur leur capacité d'interaction avec des enzymes digestives et/ou gastro-intestinales et leurs substrats. Goñi et al. (2000) et Nwosu et al. (2011) ont montré que les alginates peuvent générer des solutions visqueuses, qui peuvent agir comme une barrière à la digestion de l'amidon et, par conséquent, peuvent avoir un impact sur l'absorption du glucose. En plus de l'inhibition de l' α -amylase, de nombreuses autres études ont montré que les alginates sont capables de bloquer les enzymes digestives telle que la lipase pancréatique et la pepsine, et permettent de réduire l'absorption des triacylglycérols, du cholestérol et du glucose dans l'intestin (Chater et al., 2015).

Concernant les fucoïdanes, Koh et al. (2020) et Wen et al. (2021) ont expliqué la capacité de ces derniers à former des liaisons hydrogènes avec l' α -amylase. Les doublets des atomes d'oxygène des groupements sulfate associés aux carbones C-2 et/ou C-3 sont également impliqués dans la formation de liaisons de type hydrogène ou des ponts salins avec des acides aminés de l' α -amylase. Wen et al. (2021) ont ainsi révélé que l'inhibition de l' α -amylase et de l'activité hypoglycémique étaient influencées par le degré de sulfatation et la position des groupes sulfatés. Il a également été démontré que les fucoïdanes réduisent l'accumulation des graisses en induisant une lipolyse (Park et al., 2011).

I.2.5. Activité anti-trypsine

En parallèle, la capacité de FHS et AHS à inhiber la trypsine a été évaluée. **L'inhibition de la trypsine par les alginates extraits d'*H. scoparia*** était plus significative que les autres alginates décrits dans la littérature avec une **CI₅₀ d'environ 0,4 mg/mL**. Les résultats obtenus ont révélé un pouvoir inhibiteur de la trypsine par les alginates plus important que les autres alginates décrits dans la littérature (**Tableaux 9 et 10**). Cette activité inhibitrice a été corrélée avec la structure même des alginates. Strugala et al. (2005) ont montré qu'une richesse en Gula est négativement corrélée avec l'inhibition de la trypsine. Les groupes hydroxyles des résidus,

notamment ManA, sont capables de créer des interactions hydrogènes avec les acides aminés du site actif de l'enzyme.

L'inhibition de la trypsine par les fucoïdanes s'explique par les interactions électrostatiques entre les groupements sulfate des fucoïdanes et des régions chargées positivement de la caséine. De nombreuses études ont montré que l'héparine sulfatée ou des carraghénanes pouvaient inhiber les enzymes pancréatiques en raison de leurs interactions avec la caséine (Langendorff et al., 2000 ; Muthukumar et al., 2021).

I.2.6. Activité antivirale des fucoïdanes

De nombreux virus présentent une affinité aux protéoglycanes, exprimées aux surfaces des cellules eucaryotes, qui conditionne l'infection virale. Ce constat soulève la possibilité d'application des fucoïdanes (FHS) en tant qu'agent antiviral. Ainsi, le pouvoir antiviral de FHS, sous une forme native et hydrolysée, a été évalué contre HSV-1 en utilisant le Zovirax comme contrôle positif. Les résultats obtenus sont montrés dans les **tableaux 9 et 10**.

En effet, les **fucoïdanes natifs** extraits d'*H. scoparia* et les **fucoïdanes hydrolysés** présentent des activités antivirales avec des concentrations effectives **CE₅₀** de l'ordre de **19,44 ± 0,36** et **27,84 ± 1,61 µg/mL**, respectivement, pour une **MOI de 0,001 DI₅₀/cellules**. Ce résultat a été aussi en concordance avec le contrôle Zovirax qui présentait une **activité cytotoxique CC₅₀ inférieure à 200 µg/mL** et suggérait que ces polysaccharides sulfatés étaient bénéfiques. FHS présentent des activités prometteuses anti-HSV qui pourraient être valorisées dans de nouvelles applications pharmaceutiques. Des études antérieures ont montré que de nombreux polysaccharides sulfatés ont la capacité de limiter l'infection par le virus herpès simplex HSV-1 en empêchant les étapes d'adsorption, de pénétration, d'adhérence et de transmission virale de cellule à cellule (Ghosh et al., 2009). Sun et al. (2020) ont également démontré que la position des groupements sulfate, en particulier en positions C-2 et C-4, était de première importance pour l'activité antivirale. Claus-Desbonnet et al. (2022) ont aussi mis en évidence l'influence de la masse molaire des polysaccharides sur les activités antivirales et ont montré que l'effet inhibiteur des polysaccharides sulfatés augmente avec le poids moléculaire, l'activité la plus élevée se situant généralement entre 10 et 100 kDa. Par exemple, l'effet anti HSV-1 du sulfate de chondroïtine E (~70 kDa) (CI₅₀ = 0,06 à 0,2 µg mL⁻¹) est plus fort que celui de l'héparine (~12,5 kDa) (CI₅₀ = 1,0-0,8 µg mL⁻¹).

I.2.7. Test d'élicitation des alginates

La stimulation de la voie de défense des phénylpropanoïdes dans les feuilles des plantules de tomate en réponse aux traitements aux alginates et aux oligo-alginates (3 g/L) (El Modafar et al., 2012) a été évaluée en mesurant l'activité PAL et la production de composés phénoliques. En effet les alginates et les oligo-alginates sont décrits dans la littérature comme d'excellents stimulants naturels des défenses des plantes, et pourraient être utilisés comme alternative et/ou en combinaison avec des traitements phytosanitaires plus classiques (Salachna et al., 2018).

Les traitements des plantules de tomates en utilisant des fractions hydrolysées de AHS (**oligo-alginates obtenus après 4 h et 8 h de dépolymérisation radicalaire**) ont entraîné une **augmentation** significative ($< 0,0001$) de 2 à 3 fois des niveaux de **production de l'enzyme PAL dans les feuilles de plantules de tomates** par rapport au témoin. En effet, cette augmentation était de l'ordre de **14,094 $\mu\text{mol}/\text{mg de prot}/\text{h}/\text{mg de MF}$** et **17,388 $\mu\text{mol}/\text{mg de prot}/\text{h}/\text{mg de MF}$** en comparaison avec le **contrôle** qui présente une activité PAL de l'ordre de **6,253 $\mu\text{mol}/\text{mg de prot}/\text{h}/\text{mg de MF}$** . Parallèlement, les traitements en utilisant **des alginates (AHS)** ont entraîné une **augmentation des niveaux de PAL dans les feuilles de plantules** de tomates par rapport au témoin. **L'activité PAL** a cependant significativement **augmenté de 4 à 5 fois** dans **les racines de plantules de tomates après traitement avec AHS**, en présentant une activité PAL de l'ordre de **27,358 $\mu\text{mol}/\text{mg de prot}/\text{h}/\text{mg de MF}$** , valeur qui est élevé par rapport au **témoin (5,276 $\mu\text{mol}/\text{mg de prot}/\text{h}/\text{mg de MF}$)**, alors que l'augmentation était plus raisonnée (**2 à 3 fois**) avec les **oligo-alginates**. Les plantules de tomates pré-traitées avec des solutions d'alginate et d'oligo-alginates à une concentration de 3 mg/mL semblent pouvoir accumuler plus de composés phénoliques que les témoins négatifs. L'utilisation de l'AHS a conduit une **augmentation significative** ($< 0,006$) des **teneurs en polyphénols dans les racines de tomate** de l'ordre de **0,383 ($\mu\text{g d'acide gallique /g de MF}$)** par rapport au **témoin** qui est de l'ordre de **0,194 ($\mu\text{g d'acide gallique /g de MF}$)**. En outre, les deux fractions des **oligo-alginates** présentent une capacité plus élevée pour induire la **synthèse des polyphénols dans les feuilles** (de l'ordre de **3,579 et 3,862 $\mu\text{g d'acide gallique /g de MF}$**) par rapport aux **alginates (2,489 $\mu\text{g d'acide gallique /g de MF}$)** et au **contrôle (1,125 $\mu\text{g d'acide gallique /g de MF}$)**. Il a été prouvé que les oligo-alginates ainsi que les alginates permettent d'améliorer l'efficacité de l'induction des mécanismes de défense, par exemple dans le modèle oja (Salachna et al., 2018).

AHS et ses versions hydrolysées peuvent donc augmenter les niveaux des indicateurs biochimiques des réactions de défenses contre les phytopathogènes tels que l'activité PAL et les composés phénoliques. Ceci est en accord avec les résultats de Aitouguinane et al. (2020), qui ont montré les propriétés élicitrices des alginates (et de dérivés oligosaccharidiques) extraits de l'algue brune *B. bifurcata*. En effet, ces auteurs ont montré des capacités à stimuler le métabolisme des phénylpropanoïdes en augmentant l'activité de l'activité PAL dans le modèle tomate, en particulier grâce à l'utilisation d'oligo-alginates. Notons qu'injectés dans des feuilles de blé à une concentration de 0,5 mg/mL, seul des alginates fortement enrichis en Poly-ManA ont induit une augmentation de l'activité PAL après 24 h de traitement, de l'ordre de 12,35 nmol/mg de prot/h/mg de MF, ainsi qu'une capacité à accumuler les composés phénoliques de l'ordre de 20,74 µg d'acide gallique /g de MF (Aitouguinane et al., 2020). Des solutions de Poly-GulA et Poly-ManA pulvérisées sur des feuilles de tabac à une concentration de 0,5 mg/mL ont montré également que seul le mélange Poly-ManA induisait une augmentation soutenue de l'activité PAL de l'ordre de 0,7 µmol/mg de prot/h/mg (Aitouguinane et al., 2020). D'autres polysaccharides dérivés de macroalgues vertes et rouges (et leurs oligomères), comme les ulvanes, ont fait l'objet de recherches intensives afin de montrer leur capacité à stimuler les mécanismes de défense chez diverses plantes (El-modafar et al., 2012 ; Alves et al., 2013 ; Abouraïcha et al., 2015). Le traitement des rameaux de picholine marocaine avec un ulvane et une laminarine a montré que l'activité PAL pouvait augmenter significativement le deuxième jour dans les brindilles, avec des valeurs de l'ordre de 0,0016 et 0,0018 µmol/mg de prot/h/mg, respectivement, plus élevées que celles du témoin positif (0,0005 µmol/mg de prot/h/mg). Un ulvane, un carraghénane, un alginate et une laminarine ont également été testés dans des brindilles d'oliviers pour déclencher le métabolisme phénolique et contrôler la flétrissure verticillienne de l'olivier (VWO) causée par *Verticillium dahliae* (López-Moral et al., 2021). En fait, l'élicitation par ces polymères permet l'accumulation de composés phénoliques de l'ordre de 3,5, 3,8, 3,1 et 3,3 µg d'acide gallique/g de MF par rapport au contrôle (1,4 µg d'acide gallique/g de MF). L'ulvane a ainsi réduit de manière significative la progression de la maladie et sa gravité à 39,9%. La teneur en polyphénols de *B. bifurcata* a été améliorée par l'application de bioéliciteurs (les alginates et les oligo-alginates) par rapport au témoin négatif, comme le signalent Bouissil et al. (2020). L'élicitation des racines de palmier dattier par des alginates de *F. spiralis* et *B. bifurcata* est à l'origine d'une augmentation significative et intense de la teneur totale en polyphénols (2,5 fois plus élevée que dans le témoin) (Bouissil et al., 2020). L'alginate

de *Lessonia vadosa* est capable par exemple d'améliorer la teneur en polyphénol de palmier dattier (Chandía et al., 2004).

II. PRODUCTION ET PURIFICATION DES FUcoxANTHINES ET DE B-CAROTENES D'*H. scoparia* ET LEURS EFFETS SUR DES ENZYMES DIGESTIVES ET QUELQUES BACTERIES PATHOGENES

II.1. Extraction et caractérisation des caroténoïdes à partir d'*H. scoparia*

Le **rendement en fucoxanthines (P-FX)** extraits est de l'ordre de $2 \pm 0,1$ mg/g MS. Plusieurs macroalgues sont connues aussi par leur capacité à produire des fucoxanthines. Ces rendements varient en fonction des espèces. Cependant, les fucoxanthines produites par *Cystoseira indica*, *Tisochrysis lutea*, *Pavlova lutheri*, *Sargassum fusiformis* et *Sphaerotrichia divaricate* possèdent des teneurs en fucoxanthines de l'ordre de 2,3, 16,05, 20,86, 0,01 et 0,2 mg/g MS, respectivement (Jaswir et al., 2012 ; Méresse et al., 2020 ; Leong et al., 2022 ; Pajot et al., 2022). D'autres études ont révélé que les macroalgues, (Fung et al., 2013) récoltées entre l'hiver et le printemps possèdent des teneurs élevées en fucoxanthines alors que le **rendement d'extraction de β -carotène** à partir d'*H. scoparia* (P-CT) est d'environ $0,054 \pm 0,02$ mg/g MS. Cette valeur dépasse celle rapportée pour *M. pyrifera* qui était d'environ 0,0174 mg/g MS. Alors que d'autres microalgues ont des niveaux significatifs de β -carotène comme *C. fragile* et *G. chilensis* qui produisent respectivement 0,197 mg/g et 0,113 mg/g MS (Ortiz et al., 2009). La variation au niveau de ces rendement d'extraction de la fucoxanthine et du β -carotène entre les espèces peut être expliquée par les sites et les saisons de récolte des algues. De plus, les quantités des fucoxanthines et β -carotènes extractibles varient en fonction des solvants utilisés, de la durée d'extraction, de la température et des procédures de purification (Qiu et al., 2021).

La chromatographie sur colonne de silice a été utilisée pour **purifier les pigments** en utilisant un gradient hexane-acétone (Sun et al., 2019). Tout d'abord, les pigments de chlorophylles (bleu-vert) a été élué, puis les caroténoïdes et la fucoxanthine (jaune-orange), et enfin la chlorophylle *c* (vert fluorescent). La fraction jaune-orange obtenue après élution avec hexane-acétone (6:4) a été analysée ensuite par spectroscopie, et leur absorbance maximale à 450 nm a confirmé qu'elle contenait de la fucoxanthine (P-FX).

La chromatographie sur couche mince a été réalisée pour **analyser la composition** de l'extrait brut en pigment. Le profil chromatographique de l'extrait brut a indiqué la présence d'au moins 7 taches de couleurs différentes correspondant aux principaux pigments présents dans la biomasse d'*H. scoparia* comme les fucoxanthines, les β -carotènes, les chlorophylles et autres caroténoïdes. Les valeurs des Rf des différents pigments séparés ont été calculées et comparées aux valeurs obtenues pour des standards de fucoxanthine et de β -carotène. La migration de la fucoxanthine purifiée à partir de l'extrait brut représente une tache de couleur orange avec le même Rf d'environ 0,31 que celui de l'extrait brut et du standard de fucoxanthine. Jaswir et al. (2013) ont prouvé qu'une séparation optimale de la fucoxanthine à partir d'un extrait brut à en utilisant CCM se produit lorsque les valeurs **Rf sont comprises entre 0,3 et 0,5**. Rajauria & Abu-Ghannam. (2013) ont montré que la fucoxanthine extraite de l'algue brune *Himanthalia* présente un Rf de 0,36 après migration CCM. Etant donné que le β -carotène est moins polaire que la fucoxanthine, il possède moins d'affinité pour s'accrocher à la silice (Ambarwati et al., 2022). La CCM a confirmé que la pureté des β -carotènes extraits (une seule avec le même Rf d'environ 0,9 que le témoin). Cette différence entre le Rf de la fucoxanthine (P-FX) et du β -carotène (P-CT) est corrélée aux structures chimiques de ces différents pigments et leur teneur en groupes polaires (OH) et non polaires (CH). De nombreuses études ont rapporté que les carotènes sont les pigments les moins polaires (pas de groupes polaires), alors que les xanthophylles sont les plus polaires (Liaaen-Jensen & Jensen, 1971).

L'analyse par HPLC a été réalisée pour **identifier et confirmer la pureté** de la P-FX et du P-CT, en comparant les temps de rétention (RT) des spectres UV-visible de fucoxanthine et β -carotène extraits aux temps de rétention des standards. Les profils obtenus de l'extrait de fucoxanthine purifiée (P-FX) et de son standard sont similaires avec la présence d'un pic majeur à 7,6 min. Selon Wang et al. (2014), les pics majeurs à 7,7 correspondent probablement à l'isomère **trans-fucoxanthine (94,4%)**, mais les pics mineurs à 10,26 min montrent la présence d'une petite quantité d'isomères **cis-fucoxanthine (5,6%)**. Foo et al. (2017), ont montré que la fucoxanthine, extraite d'*U. pinatifida* avec la même méthode d'extraction et de purification, contenait 88% de trans-fucoxanthine et 9% de cis-fucoxanthine. Des observations similaires sont reportées pour les fucoxanthines extraites de la macroalgue *S. japonica* ou de la microalgue *Chaetoceros calcitrans* (Foo et al., 2017).

Le chromatogramme de P-CT et celui de son standard montrent des pics majeurs à 22,6 min. Selon Gebregziabher et al. (2021), dans les mêmes conditions d'extraction et d'élution de β -carotènes à partir de *T. turbinata*, des temps de rétention similaires de l'ordre de 23 min ont

été observés. En se basant sur la littérature, plusieurs études ont montré que le temps de rétention de la fraction β -carotène est influencé par le gradient d'élution. En fait, Kraay et al. (1992) a rapporté que la fraction de β -carotènes extraits du phytoplancton marin avait un temps de rétention d'environ 26 min en phase inverse sur colonne C18, avec un gradient d'acétate d'ammonium 0,5 M dans du méthanol et de l'eau (85/15, (v/v)), acétonitrile et eau (90/10, (v/v) et 100% d'acétate d'éthyle.

II.2. Activités biologiques des caroténoïdes

II.2.1. Inhibition de l' α -amylase

L' **α -amylase** est une enzyme essentielle qui contribue à la digestion des glucides et est capable de rompre les liaisons α -(1,4)-glycosidiques de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides et de générer des oligosaccharides et des disaccharides. Ainsi, l'inhibition de cette enzyme régule le diabète en réduisant l'absorption du glucose et en régulant l'hyperglycémie (Gunathilaka et al., 2020). Les valeurs des **CI₅₀ de l'extrait de P-FX** étaient d'environ **300 μ g/mL**, similaire à la fucoxanthine commercialisée et les valeurs d'**CI₅₀ de P-CT** ainsi que le β -carotène commercialisé, sont proches et de l'ordre de **500 μ g/mL**. Les deux pigments extraits de *H. scoparia* ont permis l'inhibition significative de l' α -amylase **de manière dose-dépendante** (Kawee-Ai et al., 2019). L'inhibition de l' α -amylase par la fucoxanthine extrait d'*H. scoparia* (P-FX) est cohérente avec l'inhibition de l' α -amylase par la fucoxanthine extraite de *Sargassum hemiphyllum* qui est d'environ 350 μ g/mL (Hwang et al., 2015). Kawee-Ai et al. (2019) ont expliqué l'effet inhibiteur de la fucoxanthine sur l' α -amylase par la formation de liaisons de type hydrogène entre les groupements hydroxyle et les groupements carboxylate présents dans le site actif de l' α -amylase. Yusuf et al. (2021) ont également démontré que des extraits de carottes riches en β -carotènes avaient un potentiel inhibiteur de l' α -amylase, avec une CI₅₀ allant de 107,85 à 807,92 mg/mL. Aussi, les terpénoïdes, principalement le squalène, pourraient présenter des effets d'inhibition de l' α -amylase (Conforti et al., 2005 ; Sales et al., 2012).

II.2.2. Inhibition de la trypsine

La **trypsine** permet l'inactivation de l'insuline et l'augmentation de la concentration d'amylase pancréatique et intestinale. De nombreuses études ont rapporté que l'administration orale d'inhibiteurs de la trypsine était une thérapie qui abaissait la sécrétion de glucose dans le sang et augmentait la résistance à l'insuline (Ihse et al., 1976). De ce fait, des analyses ont été

réalisées afin de déterminer l'effet inhibiteur des P-FX et P-CT sur la trypsine. Les résultats obtenus montrent une légère différence entre les valeurs de **CI₅₀** de la **fucoxanthine purifiée (P-FX)** et de son standard d'environ **800 et 850 µg/mL**, respectivement. Aussi, des valeurs proches de **CI₅₀ d'environ 800 et 900 µg/mL** entre le β-carotène purifié (P-CT) et son standard. Ces effets inhibiteurs pourraient être expliqués par la perturbation de la conformation de la trypsine due à son interaction avec les pigments purifiés. En fait, Wang et al. (2014) ont rapporté que le bisphénol qui est un composé organique contenant des groupements hydroxyle peut affecter la structure secondaire et tertiaire de la trypsine. De plus, Cudina et Jovanović. (1988) ont confirmé que les groupements hydroxyle pouvaient réagir avec la trypsine et provoquer son inactivation.

II.2.3 Activité antibactérienne

Trois bactéries pathogènes responsables d'infections gastro-intestinales ont été utilisées pour tester le potentiel antibactérien des P-FX et P-CT extraits. La **concentration minimale inhibitrice (CMI)** de la **fucoxanthine purifiée** contre *L. monocytogenes* était de l'ordre de **1 250 ± 50 µg/mL**. Rajauria & Abu-Ghannam (2013) ont rapporté que l'activité antimicrobienne de la fucoxanthine purifiée de *Himantalia* contre *L. monocytogenes* était de 1 mg/mL. Il a été rapporté que la fucoxanthine avait une activité antibactérienne importante principalement contre les bactéries aérobies à des concentrations allant de 10 à 250 µg/mL, et de faibles activités contre les bactéries anaérobies malgré des doses supérieures à 1 000 µg/mL (Rajauria & Abu-Ghannam, 2013). Selon la littérature, les composés naturels ayant un CMI supérieure à 1 000 µg/mL sont considérés comme faiblement antibactériens (Abou-Dobara, 2013 ; Karpiński & Adamczak, 2019).

Le P-CT montre une **CMI** contre *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *S. enterica* à **225 ± 50, 112,5 ± 18 et 225 ± 10 µg/mL**, respectivement. Ces valeurs ont significativement supérieures à celles décrites dans la littérature. Abdulhadi et al. (2020) ont rapporté que le β-carotène isolé de *Suillus* sp. possède une activité antibactérienne contre la *Klebsiella* sp., *E. coli* et *S. aureus* avec une CMI d'environ 100 mg/mL. Ces résultats confirment l'utilisation potentielle des β-carotènes d'*H. scoparia* comme agent antibactérien.

III. BIOCONVERSION DE LA MACROALGUE BRUNE TUNISIENNE *H. scoparia* : APPLICATION A L'ÉNERGIE

Nous nous sommes intéressés à l'étude biochimique d'*H. scoparia*, des fractions générées au cours de la thèse (polysaccharides et pigments) ainsi qu'aux sous-produits issus des différentes étapes d'extraction. L'objectif était de faire démontrer le potentiel d'*H. scoparia* comme bioressource pour la **production de vecteurs énergétiques**.

III.1. Composition biochimique de la macroalgue brune *H. scoparia*

Une étude qualitative de *H. scoparia* a montré que la **biomasse d'*H. scoparia*** contient **3% de lipides** et **7% de protéines**. Ces valeurs sont cohérentes avec la littérature qui montre que la teneur en protéines des algues brunes peut varier de 3% à 15% (Fleurence et al., 1999), avec des teneurs en lipides d'environ 5% (Miyashita et al., 2013). *H. scoparia* est caractérisée par des **teneurs en cendres** et en **humidité** d'environ **43%** et **7%**, respectivement. Ces teneurs sont cohérentes avec des études précédentes qui montrent que les teneurs en cendres peuvent varier de 24% à 49% et l'humidité de 4% à plus de 18%, selon la saison et le genre de l'algue brune (Rosell et al., 1984 ; Hay et al., 1990). La faible teneur en humidité chez *H. scoparia* est en concordance avec les valeurs rapportées pour la macroalgue brune *U. pinatifida*, dédiée d'ailleurs à la production de biocarburants (Cassani et al., 2022). *H. scoparia* est composé de **4,4% des composés phénoliques** ce qui est proche de la teneur trouvée pour la macroalgue brune tunisienne *C. compressa*, avec une valeur d'environ 4,8% (Generalic Mekinić et al., 2019 ; Chkhikvishvili et al., 2000). Il est à noter que la période de récolte est un facteur important qui peut affecter indirectement la composition biochimique des macroalgues (Ahmad et al., 2017).

Selon Suutari et al. (2015), le niveau de protéines peut avoir un impact sur le potentiel de bioconversion des macroalgues par diverses bactéries. Par exemple, une teneur élevée en protéines d'environ (7 à 20%) peut réduire la production de biohydrogène (Xia et al., 2015). Il a été démontré que la bioconversion des macroalgues, possédant des teneurs élevées en protéines solubles, pourraient produire de l'ammoniac toxique (Xia et al., 2015). Dans le cas des macroalgues brunes, la dégradation microbienne des protéines constitutives a été inhibée, en raison de leur localisation cellulaire et de leurs liaisons avec les polysaccharides de la paroi cellulaire (Thompson et al., 2017). En plus, Hou et al. (2015) ont rapporté que la production de

bio-éthanol suite à la bioconversion des macroalgues est corrélée essentiellement avec la teneur en glucides, plutôt qu'à la teneur en protéines, (Hou et al., 2015). D'une façon générale et à la vue des faibles concentrations en lipides, la production de biocarburants à partir de *H. scoparia* dépend principalement de la conversion de ses glucides constitutifs pour produire du bio-éthanol ou du bio-H₂. Notons toutefois que *H. scoparia* est caractérisée par une teneur élevée en cendres liée à sa composition en minéraux. Ces micronutriments peuvent ainsi servir à améliorer la conversion biologique, e.g. la digestion anaérobie (Mayala et al., 2022). La conversion biologique constitue la procédure de conversion la plus idéale pour ce type d'algues (Montingelli et al., 2015). Toutefois, cette forte teneur en cendres pourrait être à l'origine de faibles rendements selon Bae et al. (2011). Certains pré-traitements de la biomasse macroalgale sont parfois bénéfiques pour la réduction des teneurs en cendres (Bae et al., 2011), ces dernières (si > 20%) pouvant générer des problèmes de scories et d'encrassements, et donc des problèmes dans la production des biocarburants (Balina et al., 2016). *H. scoparia* est composée également de métaux alcalins, tels que K et Na. Ces éléments peuvent causer des problèmes d'encrassement et de scorification lors de la gazéification et la production de biohydrogène (Milla et al., 2014). Les fortes concentrations de métaux alcalins peuvent également provoquer l'inhibition de la production de bio-éthanol (Milla et al., 2014).

Enfin, *H. scoparia* (RPS) contient également des macro-, des micro-éléments et des métaux lourds. D'après la littérature, les niveaux de ces éléments sont variables selon les espèces (Fleurence et al., 1999), mais ces teneurs sont faibles (macro- et micro-éléments) ou trop fortes (métaux lourds), excluant une utilisation de notre algue dans l'alimentation (Balina et al., 2016).

H. scoparia (RPS) est caractérisée par une **concentration en glucides** d'environ **133,9 g/kg**, cette teneur étant plus élevée que celle mesurée par exemple pour *S. vulgare* ($31,03 \pm 6,59$ g/kg) ou *C. barbata* (9,6 g/kg) (Rosell et al., 1984). Les **sous-produits d'extraction** des polysaccharides et des pigments **BP1-PS** et **BP2-F** sont composées de **glucides** avec des teneurs de l'ordre de **$79,02 \pm 0,03$ g/kg** et **$113,20 \pm 0,04$ g/kg**, respectivement. Ces teneurs en glucides, ainsi que les teneurs en sucres réducteurs des sous-produits, sont proches des quantités des glucides rapportées pour les macroalgues brunes, telles que *Sargassum obtusifolium* et *Rosenvingea nhatrangensis* (respectivement 123 et 12,6 g/kg) (Hay et al., 1990), ce qui confirme **la possibilité de leurs utilisation comme matières premières** pour la fermentation, etc.

III.2. Production des biocarburants à partir d'*H. scoparia* et sous-produits d'extractions BP1-PS et BP2-F

III.2.1. Production de bio-éthanol

Les fractions RPS, BP1-PS et BP2-F ont été soumis à une **fermentation** et ont été utilisées comme substrats pour **générer du bio-éthanol** à partir de *Saccharomyces cerevisiae* **ATCC 7754**. Cette souche a été sélectionnée pour sa capacité à produire des concentrations importantes d'éthanol, sa faible sensibilité à une forte concentration d'éthanol et sa grande sélectivité pour les sucres fermentescibles tels que le glucose, le galactose et le mannose lors de la fermentation (Chkhikvishvili et al., 2000 ; Cassani et al., 2022). La production d'éthanol à partir de glucose (contrôle positif) était d'environ (0,51 g d'éthanol/g de glucose) soit 5,2 g/L d'éthanol, alors que les substrats RPS, BP1-PS et BP2-F ont permis la production d'éthanol, au cours des trois jours de fermentation, avec des concentrations allant de **0,65 à 0,72 g/L**. Ces valeurs correspondent à **0,35, 0,345 et 0,325 g d'éthanol/g MS** pour RPS, BP1-PS et BP2-F, respectivement. La différence entre la production d'éthanol de BP1-PS et BP2-F s'explique par la légère différence au niveau de leur teneur initiale en sucres réducteurs. La différence entre le rendement en éthanol produit à partir de BP1-PS et BP2-F et le rendement en RPS pourrait être lié aux **composés phénoliques** présents dans le RPS, qui sont supérieurs à ceux des deux sous-produits (4,4%). Chen et al. (2020) ont montré que les composés phénoliques peuvent affecter la capacité de fermentation de *S. cerevisiae* et réduire ainsi la production d'éthanol en raison de leurs propriétés antimicrobiennes (Chen et al., 2020). Nos résultats étaient supérieurs à ceux rapportés pour la macroalgue non traitée telle que *S. japonica* (0,281 g éthanol/g MS) et *L. japonica* (0,28 g éthanol/g MS) (Generalic Mekinić et al., 2019). Selon Obata et al. (2016), cette différence pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité des sucres fermentescibles constitutifs de chaque macroalgue.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les algues brunes pré-traitées (pré-traitements mécaniques, acides et/ou hydrolyses enzymatiques) comme *Sargassum vulgare* et *P. tetrastrum*, présentent des rendements plus élevés de 0,38 et jusqu'à 0,66 g éthanol/g MS (Ganesan et al., 2012). Par exemple, le lavage, le séchage, le broyage et le chauffage (121°C pendant 20 min dans un autoclave) des macroalgues peuvent être efficaces pour libérer des biomolécules fermentescibles, en décomposant la couche externe de la paroi cellulaire (Suutari et al., 2015 ; Ahmad et al., 2017). La combinaison de pré-traitements mécaniques avec l'utilisation d'enzymes peut également réduire la génération d'inhibiteurs de fermentation

(Xia et al., 2015 ; Thompson et al., 2019). De ce fait, **d'autres expériences doivent être planifiées pour améliorer la production d'éthanol** par un pré-traitement, en particulier pour la fraction RPS afin de générer plus des polymères fermentescibles, d'oligo- et de monomères (Ozgun et al., 2015 ; Bonanno et al., 2018).

D'autres études ont souligné que non seulement les hydrolyses enzymatiques peuvent affecter les rendements de fermentation, mais d'autres éléments supplémentaires peuvent modifier la production de bioéthanol. Mutripah et al. (2014) ont montré qu'une hydrolyse acide de l'algue avec H_2SO_4 à $121^\circ C$ pendant 15 min permettait de générer une teneur en sucres réducteurs d'environ 60 g/kg MS, en utilisant la macroalgue *P. australis* contenant environ initialement 145 g/kg MS de glucides (teneur proche de celle de *H. scoparia*, i.e. 133 g/kg MS). Cependant, l'utilisation de la biomasse non traitée d'*H. scoparia* comme substrat de fermentation a permis d'obtenir un rendement en éthanol plus élevé (0,35 g d'éthanol/g DW) que celui rapporté pour la biomasse traitée de *P. australis* qui était de l'ordre de (0,002 g d'éthanol/g DW). Cette découverte pourrait être due au niveau élevé de 5-HMF et d'acide lévulinique obtenu après hydrolyse avec H_2SO_4 , ce qui pourrait inhiber le processus de fermentation (Mutripah et al., 2014). Cela confirme l'importance de choisir le pré-traitement d'hydrolyse approprié pour augmenter significativement la production de bio-éthanol. L'utilisation de diverses enzymes dans le mélange, telles que des alginates lyases, des oligo-alginates lyases et des cellulases, peut augmenter les rendements en éthanol, comme indiqué pour la biomasse de *M. pyrifera* (Ravanel et al., 2017). Plusieurs études ont confirmé que les traitements enzymatiques pouvaient être suffisants pour augmenter la libération de glucose, en évitant les problèmes de fermentation causés par un pré-traitement acide et/ou thermique (Ravanel et al., 2017).

Le choix des souches fongiques ou microbiennes est un paramètre crucial pour le processus de fermentation. L'identification des organismes capables de convertir des sucres hétérogènes reste un défi dans la production de bioéthanol à partir de macroalgues (Offei et al., 2018). En effet, des levures spécifiques pourraient être utilisées dans le processus de fermentation, compte tenu de leur tolérance aux fortes teneurs en sels et en cendres (Khambhaty et al., 2013). Il a été souligné que l'utilisation de la levure *Candida* sp. pouvait augmenter le rendement d'éthanol jusqu'à 1,76% pour la macroalgue *Kappaphycus alvarezii*, malgré de fortes concentrations en sel (Khambhaty et al., 2013). Offei et al. (2018) ont montré que l'acclimatation des levures à des concentrations de substrats plus élevées est aussi une solution pour augmenter la production d'éthanol (Offei et al., 2018). Ceci a été accompli en utilisant une fermentation en deux étapes des hydrolysats obtenus de *S. japonica* (Ra et al., 2013). En

effet, *S. cerevisiae* KCCM 1129 a été utilisé dans la première étape de fermentation de *S. japonica* pour convertir la teneur en glucose en éthanol, tandis que *P. angophorae* KCTC 17574 a été utilisé dans une deuxième étape de fermentation pour transformer le contenu en mannitol en éthanol. La levure *P. angophorae* KCTC 17574 acclimatée a pu produire environ 0,3 g d'éthanol/g de mannitol, au lieu de 0,13 g d'éthanol/g de mannitol pour celle non acclimatée. Notons que la technique de fermentation en utilisant simultanément la saccharification et la fermentation (SSF), est une méthode plus productive que la séparation entre l'hydrolyse et la fermentation (SHF). Cela fait gagner du temps en diminuant les problèmes de contamination (Olofsson et al., 2008).

III.2.2. Production de biohydrogène

L'analyse des résultats de **production des acides gras volatils** (AGV) et de **biohydrogène** par un **consortium bactérien** pendant 24 h à l'obscurité, en utilisant les fractions RPS, BP1-PS et BP2-F comme substrats ont démontré que chaque fraction peut être utilisée comme matière première pour générer du biohydrogène, **13 mL H₂/g MS** (environ 1/3 du rendement en utilisant du glucose) alors que dans les mêmes conditions, le glucose (témoin positif) permet de produire 1,85 g/L butyrate, 479 mg/L acétate, 72 mg/L propionate, 40 mL H₂/g glucose (correspondant à 43% H₂ dans le biogaz total). En se référant à la littérature, ces résultats sont inférieurs à ceux observés en utilisant la macroalgue *Huzikia husiforme* sp. (10,3 mL H₂/g MS) (Abdel-Fattah et al., 1970) ou l'algue brune *L. japonica* (58,5 mL H₂/g MS) comme substrats, préalablement prétraités pour générer plus des sucres afin d'améliorer la production de biohydrogène (Maneein et al., 2018 ; Khalid et al., 2019). Cependant, le rendement en H₂ produit à partir d'*H. scoparia* (13 mL H₂/g MS) était légèrement supérieur au rendement de biohydrogène produit à partir de la biomasse non traitée de *L. japonica* (10 mL H₂/g MS) (Fasahati et al., 2012).

La production de H₂ était couplée à celles de l'acétate et du butyrate. Une différence significative ($p < 0,05$) a été observée concernant la concentration en butyrate (**612 mg/L**), deux fois plus élevée à partir de la fraction RPS qu'avec les fractions BP1-PS et BP2-F. Ces résultats sont en concordance avec la teneur en sucres réducteurs qui est de l'ordre de 39,5 g/kg PS au niveau de RPS. Les concentrations d'acétate étaient proches d'environ 154, 205 et 225 mg/L pour BP2-F, BP1-PS et RPS, respectivement. Ces teneurs en butyrate ont été légèrement inférieures à celles produites à partir de *L. japonica*, *P. elliptica* et *E. critina* (1,9, 2,5 et 2,8 g/L, respectivement), et aussi inférieures aux valeurs répertoriées en acétate (4,5, 2,2 et 2,8 g/L,

respectivement) et propionate (0,6, 0,4 et 0,4 g/L, respectivement) (Abdel-Fattah et al., 1970 ; Khalid et al., 2019 ; Chen et al., 2020).

Selon la littérature, de nombreux facteurs, tels que le pH, peuvent affecter le rendement de production de H₂ à partir des macroalgues. En effet, le pH optimal pour produire du biohydrogène à partir des différentes biomasses peut varier entre 5,2 et 7, le butyrate étant le principal AGV, produit à pH 7 (Noblecourt et al., 2018). La voie du butyrate a été préférentiellement utilisée par le consortium bactérien afin de produire du biogaz à partir de *H. scoparia* ; l'acétate et le propionate ayant été produits dans un second temps (Noblecourt et al., 2018). Afin d'augmenter la production de H₂, des pré-traitements thermiques de la biomasse sont importants pour libérer des alditols et des sucres spécifiques, qui pourraient être finalement convertis en pyruvate, H₂, acide butyrique et acétate. Cette **étape de pré-traitement semble bénéfique** compte tenu de la difficulté de fermentation du mannitol dans des conditions anaérobies. Liu et al. (2014) ont montré que le pré-traitement thermique de *L. japonica* à 200°C peut permettre d'atteindre un rendement d'environ 85,45 mL H₂/g MS, en comparaison avec la biomasse non traitée (10 mL H₂/g MS). Enfin, la faible production de H₂ à partir de *H. scoparia* pourrait également être due à la faible concentration initiale du substrat (1%). En effet, de nombreuses études ont rapporté **l'effet des concentrations des substrats** sur la production de H₂ et en utilisant *L. japonica*, la concentration optimale du substrat a été rapporté à 2% pour une production maximale de biohydrogène d'environ (75,88 mL H₂/g MS) (Liu et al., 2014).

III.2.3. Production de bio-diesel

Les fractions RPS, BP1-PS et BP2-F ont montré des différences significatives ($p < 0,05$) en termes **des concentrations en lipides produits par *Y. lipolytica***, avec des valeurs d'environ **30,5, 1,6 et 13,3 mg/L**, respectivement. En comparaison avec la production des lipides à partir du glucose de l'ordre de 155 mg/L, ces substrats montrent un **faible potentiel**, probablement en raison de la présence de fortes concentrations d'azote dans le milieu et d'un rapport C:N initialement déséquilibré, conduisant à un faible rendement de conversion du contenu lipidique (Fasahati et al., 2012). *Y. lipolytica* n'est pas capable d'utiliser les AGV produits dans le milieu de culture pour fabriquer des lipides intracellulaires. La teneur totale en lipides est le principal indicateur de la production de bio-diesel à partir de macroalgues. Rappelons que *H. scoparia* est caractérisé par une teneur en lipides proche de 3% MS. Cette faible teneur est cohérente avec la littérature et les résultats obtenus. Song et al. (2015) ont rapporté que le niveau des lipides des macroalgues brunes est souvent inférieur à 5% MS,

soulignant leur **faible potentiel de production de bio-diesel**. En se basant sur la littérature, la fluctuation des taux des lipides est influencée par des conditions environnementales ainsi que le potentiel intrinsèque des macroalgues (Jeliani et al., 2021).

Les fractions RPS, BP1-PS et BP2-F ont permis d'accéder aux **mêmes profils d'AGV**. En outre, les teneurs en **acides linoléique (C18 : 2)** et **oléique (C18 : 1)** sont cohérentes avec la littérature et représentent environ **80%** (Chen et al., 2015). La composition des acides gras des huiles de soja et de jatropha utilisées pour générer du bio-diesel aux États-Unis et dans l'Union européenne est d'ailleurs similaire à la composition des acides gras obtenue dans notre étude. Fei et al. (2011) ont également montré que le pré-traitement des biomasses est une étape cruciale pour atteindre des rendements élevés en glucides (alginate et mannitol) ainsi qu'en AGV qui vont être utilisés par les levures oléagineuses, telles que *Y. lipolytica*, afin de produire du bio-diesel de haute qualité. En effet, les types des acides gras et le rapport entre les acides gras saturés et les acides gras insaturés jouent un rôle important dans la détermination de la qualité du bio-diesel produit à partir des macroalgues.

Enfin, *H. scoparia* a montré un rapport **UFAs > SFAs**. Les concentrations en AGS d'*H. scoparia* sont plus élevées (11%) que celles des AGS produits à partir de *S. trinodis* (1,18%) (Jeliani et al., 2021) Des quantités élevées d'AGS peuvent améliorer la stabilité du bio-diesel, tandis que des niveaux élevés d'AGI peuvent améliorer la fluidité du bio-diesel. En conclusion, la combinaison des AGI et AGS sert pour la production de meilleures qualités de bio-diesel (Jeliani et al., 2021).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le présent travail s'est déroulé dans le cadre du projet Projet Hubert Curien PHC Maghreb « Explore 19 MAG 36 » (Campus France) entre l'Unité de Biotechnologie des Algues (UBA) de l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax (ENIS) de l'Université de Sfax (Tunisie), l'équipe 4Bio de l'axe Génie des Procédés Energétique et Biosystèmes de l'Institut Pascal (UMR CNRS 6602) à l'Université Clermont Auvergne (France), le Laboratoire de protection des écosystèmes des zones arides et semi-arides de l'Université Kasdi Merbah à Ouargla (Algérie) et le Centre d'Agrobiotechnologie et Bioingénierie, Unité de Recherche Labellisée CNRST (CentreAgroBiotech-URL-CNRST-05) de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cadi Ayyad à Marrakech.

La méthodologie utilisée dans le cadre du projet EXPLORE suit une schéma classique (**Figure 70**) allant de l'extraction des polysaccharides jusqu'à l'exploration de leurs potentiels physico-chimiques et biologiques en passant par des analyses structurales.

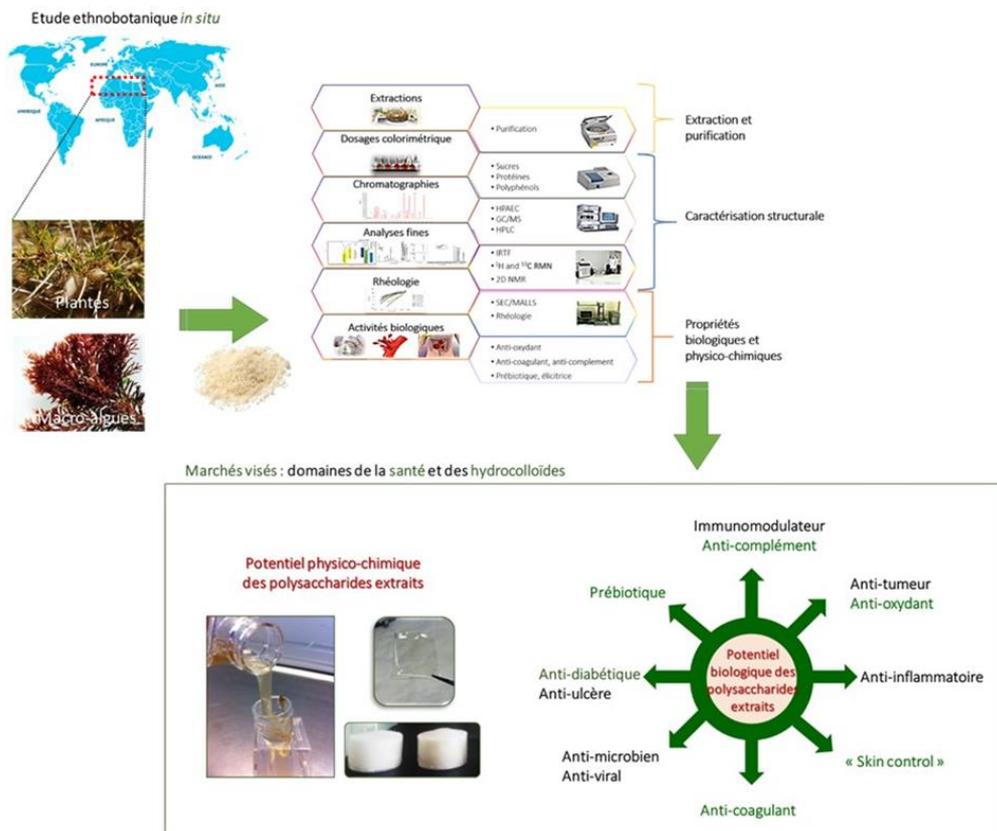


Figure 70. Objectifs scientifiques et méthodologies de l'extraction à l'exploration des potentiels biologiques des polysaccharides.

Ce travail de thèse avait pour objectif d'explorer et valoriser les ressources marines du littoral tunisien. Cette étude s'est focalisée sur le potentiel de la macroalgue *H. scoparia* collectée près des côtes de Tabarka (Tunisie) pour produire deux hydrocolloïdes caractéristiques de macroalgues brunes, à savoir les fucoïdanes et les alginates. Ces deux polysaccharides hydrosolubles ont été extraits, purifiés, et caractérisés à l'échelle structurale. Avec des rendements d'extraction variant entre 1,16% (fucoïdanes, FHS) et 12,04% (alginates, AHS), les analyses structurales ont révélé que FHS était un hétérogalactofucane sulfaté ayant un rapport Fucp/Galp de 2,4. La fraction AHS, un alginate de sodium, présentait des valeurs F_G et F_M de 74% et 26%, respectivement. Avec un rapport M/G < 1, AHS tend à former des gels rigides, ce qui a été confirmé par l'étude rhéologique en régime semi-dilué. Plusieurs propriétés biologiques des fractions FHS et AHS ont été évaluées en relation avec les structures identifiées ainsi que les objectifs du programme PHC EXPLORE (**Figure 71**).

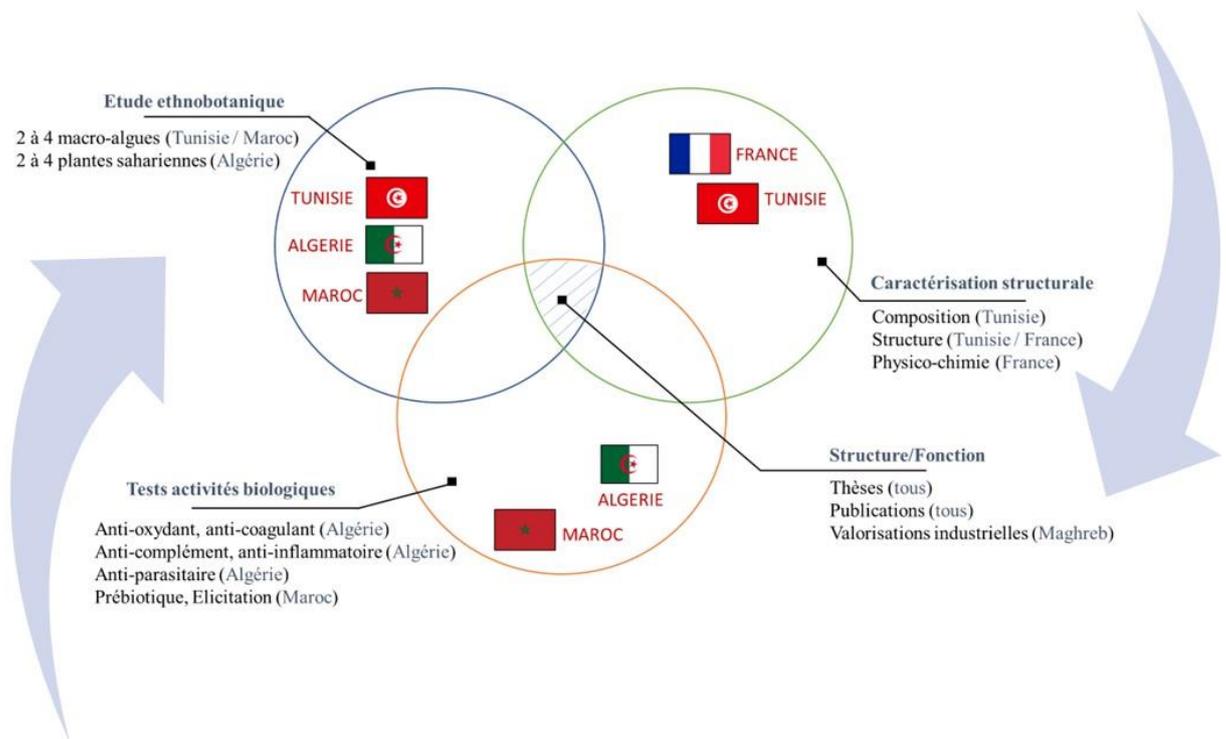


Figure 71. Intégration et travail d'équipe au cours du projet PHC EXPLORE.

Ainsi, nous avons montré *via* des tests *in vitro* que FHS et AHS présentent des propriétés antioxydantes, antivirales, antidiabétique, anti-inflammatoire et anticoagulante. En effet, FHS a montré une activité antiradicalaire avec une CI_{50} d'environ 1,1 mg/mL et a révélé une capacité antioxydante contre le DPPH proche de 76,66% à une concentration de 2 mg/mL, un pouvoir

chélateur des ions ferreux de 76%, un pouvoir réducteur du complexe Fe^{3+} /ferricyanure de l'ordre de 0,135 mg/mL avec une activité de piégeage contre superoxyde d'anion d'environ 13,94% en plus d'une activité de piégeage du radical hydroxyle qui est de l'ordre de 64%. Par contre, à une concentration de 2 mg/mL, l'AHS présente un maximum d'activité antiradicalaire de 35,8%, un pouvoir chélateur des ions ferreux d'environ d'environ 62,47%, une activité chélatante qui présente un CI_{50} d'environ 0,2 mg/mL, une activité réductrice du complexe Fe^{3+} /ferricyanure de l'ordre de 0,89 mg/mL, une activité de piégeage contre superoxyde d'anion de AHS été d'environ 11,22% et une activité de piégeage du radical hydroxyle étaient de l'ordre de 10%.

FHS et AHS possèdent un pouvoir anti-inflammatoire suite à l'inhibition de la dénaturation des protéines présentant un CI_{50} d'environ 1 mg/mL. Ces deux polymères sont de bons agents anti-coagulant. En effet, les valeurs pour l'AHS étaient du même ordre que pour l'héparine (27 s et 100%, respectivement, à des concentrations allant de 0,625 à 10 mg/mL) tandis que celles trouvées pour FHS étaient significativement plus élevées que pour l'héparine. FHS a amélioré également le temps de coagulation de l'APTT et le taux de prothrombine, en particulier à de faibles concentrations (625 $\mu\text{g/mL}$).

En plus de leur pouvoir anticoagulant, FHS a montré une inhibition plus élevée de l' α -amylase de l'ordre de 78,89%, tandis que AHS a montré un taux d'inhibition proche de 70,64% à 2 mg/mL. Ces deux fractions, ont été capables d'inhiber l'activité de la trypsine, atteignant respectivement 80,05% et 87,52% à la même concentration soit 2 mg/mL ce qui témoigne de leurs potentiels antidiabétiques. En outre, deux fractions de fucoïdane (native et hydrolysé) ont été testées pour leurs activités antivirales et ont montré des valeurs EC_{50} significatives, de l'ordre de 19,44 et 27,84 $\mu\text{g/mL}$, respectivement, pour un MOI de 0,001 $\text{ID}_{50}/\text{cellules}$. La fraction AHS semble être plus efficace en tant qu'éliciteur lorsqu'elle était utilisée sur les racines de plantules de tomates ($p < 0,0001$), atteignant une activité PAL d'environ 27,35 ($\mu\text{mol/mg}$ de prot/h/mg de FW), par rapport par exemple aux fractions oligo-alginates (8,78 et 14,43 $\mu\text{mol/mg}$ de prot/h/mg de FW) ou le contrôle. Les oligo-alginates semblent être plus efficaces dans l'accumulation des composés phénoliques au niveau des feuilles, atteignant des valeurs de l'ordre de 3,579 et 3,868 (μg d'acide gallique /g de MF) pour les oligo-4h et oligo-6h, respectivement.

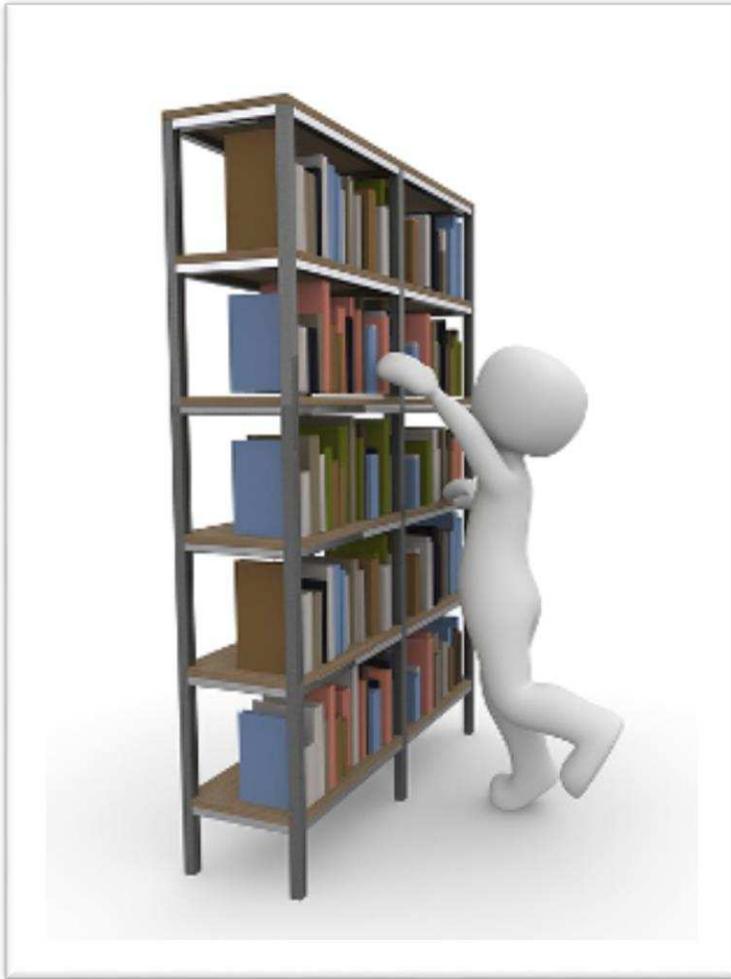
Le screening des activités biologiques a mis en avant des résultats très intéressants concernant le potentiel éliciteur de la fraction AHS et de sa version oligosaccharidique. Il serait intéressant de mener une étude plus approfondie afin d'élucider les voies métaboliques mobilisées par chaque éliciteur *via* des études transcriptomiques et protéomiques et de connaître

le niveau auquel l'éliciteur est perçu et par quel type de récepteur. L'évaluation de l'efficacité des motifs saccharidiques en plein champ et l'évaluation de leurs toxicités et de leurs biodégradabilités pourrait permettre la formulation de nouveaux stimulateurs de défense biosourcés. Nous nous proposons également de confirmer les potentialités biologiques des biomolécules de *H. scoparia* comme potentiels agents antidiabétiques, anti-inflammatoires et anticoagulants, par des tests *in vivo* afin de consolider les premiers résultats obtenus. En parallèle, nous envisageons d'étudier la fraction protéique produite par *H. scoparia*. Dans ce contexte, l'extraction des protéines, l'étude de leur composition en acides aminés et de leurs propriétés structurales et biologiques reste envisageable.

Dans un second volet de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'extraction et la valorisation des pigments de la famille des caroténoïdes à partir d'*H. scoparia*, notamment la fucoxanthine (P-FX) et le β -carotène (P-CT). Après purification, nous avons évalué leurs propriétés biologiques en tant qu'inhibiteurs d'enzymes digestives, l' α -amylase et la trypsine. Ainsi, nous avons mis en évidence le potentiel antidiabétique des deux pigments comme inhibiteur de l' α -amylase, avec des valeurs d' CI_{50} d'environ 300 $\mu\text{g/mL}$ et 500 $\mu\text{g/mL}$ pour la P-FX et le P-CT, respectivement. Le pouvoir antidiabétique des deux pigments a été aussi élucidé suite à l'inhibition de la trypsine par la fucoxanthine (P-FX) et le β -carotène (P-CT) présentant des valeurs similaires de CI_{50} , variant entre 800 et 900 $\mu\text{g/mL}$. Le P-CT a montré une activité antibactérienne notable contre *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *S. enterica* avec des valeurs de CMI d'environ 225, 112,5 et 225 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. La P-FX n'a, à l'inverse, présenté qu'un effet négligeable contre *L. monocytogenes*, avec une CMI d'environ 1 250 $\mu\text{g/mL}$. Ces résultats suggèrent la possibilité de l'utilisation des fucoxanthines dans les préparations des produits fermentés dans une optique d'exploitation de leurs potentiels nutritionnels et antioxydants tout en préservant la flore bactérienne indispensable au processus fermentaire.

Enfin, le potentiel d'utilisation de la macroalgue brune et de sous-produits générés suite à l'extraction des polysaccharides et des pigments a été étudié afin de générer des vecteurs énergétiques à savoir le bio-éthanol, le biohydrogène et les lipides (bio-diesel). Les résultats obtenus ont montré que sans traitement préalable, il était possible de produire du bio-éthanol après une fermentation alcoolique avec *S. cerevisiae* en utilisant les co-produits et la biomasse de la macroalgues comme substrat, dans des rendements acceptables selon les conditions de l'étude (non optimisée), i.e. 0,35 g/g de matière sèche. Par ailleurs, les rendements de production des autres vecteurs énergétiques étaient satisfaisants avec une production de biohydrogène d'environ 1,3 mL H_2/g de matière sèche en utilisant un consortium bactérien.

Une production des lipides par *Y. lipolitica* de l'ordre 30,5 g/L de lipides, 612 mg butyrate/L, 225 mg acétate/L et 11 mg propionate/L. Ce travail prouve la possibilité de production d'alternatives énergétiques à partir de macroalgues en Tunisie, qui remplaceraient les énergies fossiles. Associée à l'extraction de molécules à haute valeur ajoutée et à l'utilisation des sous-produits d'extraction de biomolécules, des réflexions pourraient être menées afin d'initier la création de filières de bioraffinerie des macroalgues brunes en Tunisie.



RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abu-Ghannam, N., & Shannon, E. (2017). Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as functional food. *Microbial functional foods and nutraceuticals*, 39-64.

Ai, C., Jiang, P., Liu, Y., Duan, M., Sun, X., Luo, T., ... & Song, S. (2019). The specific use of alginate from *Laminaria japonica* by *Bacteroides* species determined its modulation of the *Bacteroides* community. *Food & Function*, 10(7), 4304-4314.

Antony, T., Chakraborty, K., & Dhara, S. (2022). Sulfated galactofucan from seaweed *Padina tetrastrum* attenuates proteolytic enzyme dipeptidyl-peptidase-4: a potential anti-hyperglycemic lead. *Natural Product Research*, 36(24), 6240-6251.

Alhakmani, F., Kumar, S., & Khan, S. A. (2013). Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(8), 623-627.

Aitouguinane, M., El Alaoui-Talibi, Z., Rchid, H., Fendri, I., Abdelkafi, S., Ould El-Hadj, M. D., ... & El Modafar, C. (2022). A novel sulfated glycoprotein elicitor extracted from the moroccan green seaweed *Codium decortatum* induces natural defenses in tomato. *Applied Sciences*, 12(7), 3643.

Alves, A., Sousa, R. A., & Reis, R. L. (2013). A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *Journal of Applied Phycology*, 25, 407-424.

Abouraïcha, E. F., El Alaoui-Talibi, Z., Tadlaoui-Ouafi, A., El Boutachfai, R., Petit, E., Douira, A., ... & El Modafar, C. (2017). Glucuronan and oligoglucuronans isolated from green algae activate natural defense responses in apple fruit and reduce postharvest blue and gray mold decay. *Journal of Applied Phycology*, 29, 471-480.

Ambarwati, N. S. S., Armandari, M. O., Widayat, W., Desmiaty, Y., Elya, B., Arifianti, A. E., & Ahmad, I. (2022). In vitro studies on the cytotoxicity, elastase, and tyrosinase inhibitory activities of tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) extract. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 13(3), 182.

Abou, M. A. D. M. I. (2015). Antibacterial activity of some marine algal extracts against most nosocomial bacterial infections. *The Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)*, 9(2), 281-281.

Abdulhadi, S. Y., Gergees, R. N., & Hasan, G. Q. (2020). Molecular identification, antioxidant efficacy of phenolic compounds, and antimicrobial activity of beta-carotene isolated from fruiting bodies of *Suillus* sp. *Karbala Int. J. Mod. Sci*, 6, 365-374.

Ahmad, M. S., Mehmood, M. A., Al Ayed, O. S., Ye, G., Luo, H., Ibrahim, M., ... & Qadir, G. (2017). Kinetic analyses and pyrolytic behavior of Para grass (*Urochloa mutica*) for its bioenergy potential. *Bioresource technology*, 224, 708-713.

Abdel-Fattah, A. F., & Hussein, M. M. (1970). Composition of some brown algae as influenced by seasonal variation. *Phytochemistry*, 9(4), 721-724.

Abdelkafi, S., Chamkha, M., Casalot, L., Sayadi, S., & Labat, M. (2005). Isolation and characterization of a novel *Bacillus* sp., strain YAS1, capable of transforming tyrosol under hypersaline conditions. *FEMS microbiology letters*, 252(1), 79-84.

Abdelkafi, S., Labat, M., Gam, Z. B. A., Lorquin, J., Casalot, L., & Sayadi, S. (2008). Optimized conditions for the synthesis of vanillic acid under hypersaline conditions by *Halomonas elongata* DSM 2581 T resting cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 675-680.

Aitouguinane, M., Bouissil, S., Mouhoub, A., Rchid, H., Fendri, I., Abdelkafi, S., ... & Delattre, C. (2020). Induction of natural defenses in tomato seedlings by using alginate and oligoalginates derivatives extracted from Moroccan brown algae. *Marine drugs*, 18(10), 521.

Anisha, G. S., Padmakumari, S., Patel, A. K., Pandey, A., & Singhanian, R. R. (2022). Fucoïdan from marine macroalgae: Biological actions and applications in regenerative medicine, drug delivery systems and food industry. *Bioengineering*, 9(9), 472.

Akermi, S., Smaoui, S., Elhadef, K., Fourati, M., Louhichi, N., Chaari, M., ... & Mellouli, L. (2022). Cupressus sempervirens essential oil: exploring the antibacterial multitarget mechanisms, chemcomputational toxicity prediction, and safety assessment in zebrafish embryos. *Molecules*, 27(9), 2630.

Anisimova, N., Ustyuzhanina, N., Bilan, M., Donenko, F., Usov, A., Kiselevskiy, M., & Nifantiev, N. (2017). Fucoïdan and fucosylated chondroitin sulfate stimulate hematopoiesis in cyclophosphamide-induced mice. *Marine Drugs*, 15(10), 301.

Alipour, H. J., Rezaei, M., Shabanpour, B., & Tabarsa, M. (2018). Effects of sulfated polysaccharides from green alga *Ulva intestinalis* on physicochemical properties and microstructure of silver carp surimi. *Food Hydrocolloids*, 74, 87-96.

Al-Najjar, M. A., Athamneh, T., AbuTayeh, R., Basheti, I., Leopold, C., Gurikov, P., & Smirnova, I. (2021). Evaluation of the orally administered calcium alginate aerogel on the changes of gut microbiota and hepatic and renal function of Wistar rats. *PLoS One*, 16(4), e0247633.

Ambati, R. R., Gogisetty, D., Aswathanarayana, R. G., Ravi, S., Bikkina, P. N., Bo, L., & Yuepeng, S. (2019). Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(12), 1880-1902.

Abu-Ghannam, N., & Shannon, E. (2017). Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as functional food. *Microbial functional foods and nutraceuticals*, 39-64.

Ashokkumar, V., Jayashree, S., Kumar, G., Sharmili, S. A., Gopal, M., Dharmaraj, S., ... & Ngamcharussrivichai, C. (2022). Recent technologies in biorefining of macroalgae metabolites and their industrial applications-A circular economy approach. *Bioresource technology*, 127235.

Ammar, E. E., Aioub, A. A., Elesawy, A. E., Karkour, A. M., Mouhamed, M. S., Amer, A. A., & El-Shershaby, N. A. (2022). Algae as Bio-fertilizers: Between current situation and future prospective. *Saudi Journal of Biological Sciences*.

Ajisaka, K., Yokoyama, T., & Matsuo, K. (2016). Structural characteristics and antioxidant activities of fucoidans from five brown seaweeds. *Journal of Applied Glycoscience*, 63(2), 31-37.

Apostolova, E., Lukova, P., Baldzhieva, A., Katsarov, P., Nikolova, M., Iliev, I., ... & Kokova, V. (2020). Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of fucoidan: A review. *Polymers*, 12(10), 2338.

Athukorala, Y., Jung, W. K., Vasanthan, T., & Jeon, Y. J. (2006). An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers*, 66(2), 184-191.

Alam, S., Sarker, M. M. R., Afrin, S., Richi, F. T., Zhao, C., Zhou, J. R., & Mohamed, I. N. (2021). Traditional herbal medicines, bioactive metabolites, and plant products against COVID-19: update on clinical trials and mechanism of actions. *Frontiers in pharmacology*, 12, 671498.

Asghar, A., Tan, Y. C., Shahid, M., Yow, Y. Y., & Lahiri, C. (2021). Metabolite profiling of malaysian *Gracilaria edulis* reveals eplerenone as novel antibacterial compound for drug repurposing against MDR bacteria. *Frontiers in microbiology*, 12, 653562.

Ammar, E. E., Aioub, A. A., Elesawy, A. E., Karkour, A. M., Mouhamed, M. S., Amer, A. A., & El-Shershaby, N. A. (2022). Algae as Bio-fertilizers: Between current situation and future prospective. *Saudi Journal of Biological Sciences*.

Aryee, A. N., Agyei, D., & Akanbi, T. O. (2018). Recovery and utilization of seaweed pigments in food processing. *Current Opinion in Food Science*, 19, 113-119.

Aschenbrenner, I. A., Cernava, T., Berg, G., & Grube, M. (2016). Understanding microbial multi-species symbioses. *Front Microbiol* 7: 180.

Achkar, J., Xian, M., Zhao, H., & Frost, J. W. (2005). Biosynthesis of phloroglucinol. *Journal of the American chemical society*, 127(15), 5332-5333.

Armbrust, E. V. (2009). The life of diatoms in the world's oceans. *Nature*, 459(7244), 185-192.

Ale, M. T., Maruyama, H., Tamauchi, H., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2011). Fucoidan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells in vitro and activates natural killer cells in mice in vivo. *International journal of biological macromolecules*, 49(3), 331-336.

Abka-Khajouei, R., Tounsi, L., Shahabi, N., Patel, A. K., Abdelkafi, S., & Michaud, P. (2022). Structures, properties and applications of alginates. *Marine Drugs*, 20(6), 364.

Amidon, T. E., Bujanovic, B., Liu, S., & Howard, J. R. (2011). Commercializing biorefinery technology: A case for the multi-product pathway to a viable biorefinery. *Forests*, 2(4), 929-947.

Araújo, R. G., Rodríguez-Jasso, R. M., Ruiz, H. A., Govea-Salas, M., Rosas-Flores, W., Aguilar-González, M. A., ... & Aguilar, C. N. (2020). Hydrothermal–microwave processing for starch extraction from Mexican avocado seeds: operational conditions and characterization. *Processes*, 8(7), 759.

Amengual, J., Gouranton, E., van Helden, Y. G., Hessel, S., Ribot, J., Kramer, E., ... & von Lintig, J. (2011). Beta-carotene reduces body adiposity of mice via BCMO1. *PLoS one*, 6(6), e20644.

Asemi, Z., Alizadeh, S. A., Ahmad, K., Goli, M., & Esmailzadeh, A. (2016). Effects of beta-carotene fortified synbiotic food on metabolic control of patients with type 2 diabetes mellitus: A double-blind randomized cross-over controlled clinical trial. *Clinical Nutrition*, 35(4), 819-825.

Arora, K., Kumar, P., Bose, D., Li, X., & Kulshrestha, S. (2021). Potential applications of algae in biochemical and bioenergy sector. *3 Biotech*, 11(6), 296.

Adamczyk, M., & Sajdak, M. (2018). Pyrolysis behaviours of microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Waste and biomass valorization*, 9, 2221-2235.

Assreuy, A. M. S., Gomes, D. M., da Silva, M. S. J., Torres, V. M., Siqueira, R. C. L., de Freitas Pires, A., ... & Farias, W. R. L. (2008). Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(4), 691-695.

Ahmed, N., Dhar, B. R., Pramanik, B. K., Forehead, H., Price, W. E., & Hai, F. I. (2021). A Cookbook for Bioethanol from Macroalgae: Review of Selecting and Combining Processes to Enhance Bioethanol Production. *Current Pollution Reports*, 1-18.

Afli, A., Ayari, R., & Brahim, M. (2008). Trophic organization of the macro-zoobenthic assemblages within coastal areas subjected to anthropogenic activities. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(4), 663-674.

Aresta, M., Dibenedetto, A., & Barberio, G. (2005). Utilization of macro-algae for enhanced CO₂ fixation and biofuels production: Development of a computing software for an LCA study. *Fuel processing technology*, 86(14-15), 1679-1693.

Adhikari, U., Mateu, C. G., Chattopadhyay, K., Pujol, C. A., Damonte, E. B., & Ray, B. (2006). Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytochemistry*, 67(22), 2474-2482.

Ammar, H. H., Hafsa, J., Le Cerf, D., Bouraoui, A., & Majdoub, H. (2016). Antioxidant and gastroprotective activities of polysaccharides from the tunisian brown algae. *J Tunisian Chem Soc*, 18, 80-88.

Alboofetileh, M., Rezaei, M., & Tabarsa, M. (2019). Enzyme-assisted extraction of *Nizamuddinia zanardinii* for the recovery of sulfated polysaccharides with anticancer and immune-enhancing activities. *Journal of Applied Phycology*, 31, 1391-1402.

Asaduzzaman, A. K. M., Hasan, I., Rahman, M. H., & Tareq, A. R. (2020). Antioxidant and antiproliferative activity of phytoconstituents identified from *Sargassum binderi* seaweed extracts cultivated in Bangladesh. *Int. J. Biosci*, 16(3), 481-494.

Bold, H. C. (1978). Introduction to the Algae. *Structure and reproduction*, 706.

Banerjee, J., Das, A., Sinha, M., & Saha, S. (2018). Biological efficacy of medicinal plant extracts in preventing oxidative damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.

Bedoux, G., Caamal-Fuentes, E., Boulho, R., Marty, C., Bourgougnon, N., Freile-Pelegrín, Y., & Robledo, D. (2017). Antiviral and cytotoxic activities of polysaccharides extracted from four tropical seaweed species. *Natural Product Communications*, 12(6), 1934578X1701200602.

Bae, Y. J., Ryu, C., Jeon, J. K., Park, J., Suh, D. J., Suh, Y. W., ... & Park, Y. K. (2011). The characteristics of bio-oil produced from the pyrolysis of three marine macroalgae. *Bioresource technology*, 102(3), 3512-3520.

Balina, K., Romagnoli, F., & Blumberga, D. (2016). Chemical composition and potential use of *Fucus vesiculosus* from Gulf of Riga. *Energy Procedia*, 95, 43-49.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

BeMiller, J. N. (1967). Acid-catalyzed hydrolysis of glycosides. *Advances in carbohydrate chemistry*, 22, 25-108. Kamerling, J. P., Gerwig, G. J., Vliegthart, J. F. G., & Clamp, J. R. (1975). Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochemical Journal*, 151(3), 491-495.

Bernfeld, P. (1955). [17] Amylases, α and β .

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 62(3), 293-300.

Béligon, V., Noblecourt, A., Christophe, G., Lebert, A., Larroche, C., & Fontanille, P. (2018). Proof of concept for biorefinery approach aiming at two bioenergy production compartments, hydrogen and biodiesel, coupled by an external membrane. *Biofuels*, 9(2), 163-174.

Bischof, K., Hanelt, D., & Wiencke, C. (1998). UV-radiation can affect depth-zonation of Antarctic macroalgae. *Marine Biology*, 131, 597-605.

- Bilan, M. I., Grachev, A. A., Shashkov, A. S., Nifantiev, N. E., & Usov, A. I. (2006). Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. *Carbohydrate research*, 341(2), 238-245.
- Bonanno, G., & Orlando-Bonaca, M. (2018). Chemical elements in Mediterranean macroalgae. A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 44-71.
- Bălașa, A. F., Chircov, C., & Grumezescu, A. M. (2020). Marine biocompounds for neuroprotection—A review. *Marine Drugs*, 18(6), 290.
- Bertagnolli, C., Espindola, A. P. D., Kleinübing, S. J., Tasic, L., & da Silva, M. G. C. (2014). *Sargassum filipendula* alginate from Brazil: Seasonal influence and characteristics. *Carbohydrate polymers*, 111, 619-623.
- Bischof, K., Hanelt, D., & Wiencke, C. (1998). UV-radiation can affect depth-zonation of Antarctic macroalgae. *Marine Biology*, 131, 597-605.
- Barkallah, M., Dammak, M., Louati, I., Hentati, F., Hadrich, B., Mechichi, T., ... & Abdelkafi, S. (2017). Effect of *Spirulina platensis* fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. *LWT*, 84, 323-330.
- Bahry, H., Pons, A., Abdallah, R., Pierre, G., Delattre, C., Fayad, N., ... & Vial, C. (2017). Valorization of carob waste: Definition of a second-generation bioethanol production process. *Bioresource technology*, 235, 25-34.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical biochemistry*, 54(2), 484-489.
- Bouissil, S., El Alaoui-Talibi, Z., Pierre, G., Michaud, P., El Modafar, C., & Delattre, C. (2020). Use of alginate extracted from Moroccan brown algae to stimulate natural defense in date palm roots. *Molecules*, 25(3), 720.
- Budini, R., Tonelli, D., & Girotti, S. (1980). Analysis of total phenols using the Prussian blue method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(6), 1236-1238.
- Bernfield, P. (1955). Amilase α and β . Dalam Colowick, SP and ND Kaplan (eds). New York: *Methods in Enzymology and Related of Biochemistry*.
- Ballesteros, E., & Sant, N. (2022). Homogeneity of photosynthetic features in canopy-forming macroalgae of the order Fucales from shallow and sheltered environments. *Cryptogamie, Algologie*, 43(6), 107-115.
- Bouali, C., Bouloulem, W., Bouzerira, A., & Khennouf, H. E. (2021). *Etude de la valeur nutritionnelle de l'algue maritime Caulerpa racemosa var. cylindracea (Sonder) introduite à Jijel* (Doctoral dissertation, Université de Jijel).
- Buschmann, A. H., Camus, C., Infante, J., Neori, A., Israel, Á., Hernández-González, M. C., ... & Critchley, A. T. (2017). Seaweed production: overview of the global state of

exploitation, farming and emerging research activity. *European Journal of Phycology*, 52(4), 391-406.

Bind, A., Goswami, L., & Prakash, V. (2018). Comparative analysis of floating and submerged macrophytes for heavy metal (copper, chromium, arsenic and lead) removal: sorbent preparation, characterization, regeneration and cost estimation. *Geology, Ecology, and Landscapes*, 2(2), 61-72.

Bălașa, A. F., Chircov, C., & Grumezescu, A. M. (2020). Marine biocompounds for neuroprotection—A review. *Marine Drugs*, 18(6), 290.

Bertagnolli, C., Espindola, A. P. D., Kleinübing, S. J., Tasic, L., & da Silva, M. G. C. (2014). Sargassum filipendula alginate from Brazil: Seasonal influence and characteristics. *Carbohydrate polymers*, 111, 619-623.

Bertagnolli, C., Espindola, A. P. D., Kleinübing, S. J., Tasic, L., & da Silva, M. G. C. (2014). Sargassum filipendula alginate from Brazil: Seasonal influence and characteristics. *Carbohydrate polymers*, 111, 619-623.

Bogacz-Radomska, L., & Harasym, J. (2018). β -Carotene—properties and production methods. *Food Qual Saf* 2: 69–74.

Beydoun, M. A., Chen, X., Jha, K., Beydoun, H. A., Zonderman, A. B., & Canas, J. A. (2019). Carotenoids, vitamin A, and their association with the metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition reviews*, 77(1), 32-45.

Bonet, M. L., Canas, J. A., Ribot, J., & Palou, A. (2015). Carotenoids and their conversion products in the control of adipocyte function, adiposity and obesity. *Archives of biochemistry and biophysics*, 572, 112-125.

Bruhn, A., Dahl, J., Nielsen, H. B., Nikolaisen, L., Rasmussen, M. B., Markager, S., ... & Jensen, P. D. (2011). Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: biomass yield, methane production and combustion. *Bioresource technology*, 102(3), 2595-2604.

Bilan, M. I., Grachev, A. A., Ustuzhanina, N. E., Shashkov, A. S., Nifantiev, N. E., & Usov, A. I. (2002). Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. *Carbohydrate research*, 337(8), 719-730.

Bhagwat, P., Amobonye, A., Permaul, K., & Pillai, S. (2022). Algae as a Feedstock for Bioethanol and Biomethane Production. In *Novel Feedstocks for Biofuels Production* (pp. 149-190). Singapore: Springer Nature Singapore.

Benslima, A., Sellimi, S., Hamdi, M., Nasri, R., Jridi, M., Cot, D., ... & Zouari, N. (2021). The brown seaweed *Cystoseira schiffneri* as a source of sodium alginate: Chemical and structural characterization, and antioxidant activities. *Food Bioscience*, 40, 100873.

Benaoun, F., Delattre, C., Boual, Z., Ursu, A. V., Vial, C., Gardarin, C., ... & Pierre, G. (2017). Structural characterization and rheological behavior of a heteroxylan extracted from *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae) seeds. *Carbohydrate polymers*, 175, 96-104.

Berdahl, D. R., Nahas, R. I., & Barren, J. P. (2010). Synthetic and natural antioxidant additives in food stabilization: current applications and future research. *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*, 272-320.

Bhatt, T., & Patel, K. (2020). Carotenoids: potent to prevent diseases review. *Natural Products and Bioprospecting*, 10, 109-117.

Bland, E. J., Keshavarz, T., & Bucke, C. (2004). The influence of small oligosaccharides on the immune system. *Carbohydrate Research*, 339(10), 1673-1678.

Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of applied phycology*, 23, 371-393.

Carpena, M., Garcia-Perez, P., Garcia-Oliveira, P., Chamorro, F., Otero, P., Lourenço-Lopes, C., ... & Prieto, M. A. (2022). Biological properties and potential of compounds extracted from red seaweeds. *Phytochemistry Reviews*, 1-32.

Cotas, J., Leandro, A., Pacheco, D., Gonçalves, A. M., & Pereira, L. (2020). A comprehensive review of the nutraceutical and therapeutic applications of red seaweeds (Rhodophyta). *Life*, 10(3), 19.

Costa, L. S., Fidelis, G. P., Cordeiro, S. L., Oliveira, R. M., Sabry, D. A., Câmara, R. B. G., ... & Rocha, H. A. O. (2010). Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64(1), 21-28.

Cunha, L., & Grenha, A. (2016). Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. *Marine drugs*, 14(3), 42.

Choudhury, A., Sarma, S., Sarkar, S., Kumari, M., & Dey, B. K. (2022). Polysaccharides Obtained from Vegetables: an effective source of alternative excipient. *Journal of Pharmacopuncture*, 25(4), 317-325.

Colliec Jouault, S. (1990). Préparation, caractérisation et activités biologiques de fucanes extraits d'algues brunes (Doctoral dissertation, Université Paris-Nord).

Ching, S. H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2017). Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(6), 1133-1152.

Carlucci, M. J., Scolaro, L. A., & Damonte, E. B. (1999). Inhibitory action of natural carrageenans on Herpes simplex virus infection of mouse astrocytes. *Chemotherapy*, 45(6), 429-436.

Cáceres, P. J., Carlucci, M. J., Damonte, E. B., Matsuhira, B., & Zúñiga, E. A. (2000). Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phylloporaceae): structural analysis and biological activity. *Phytochemistry*, 53(1), 81-86.

Casu, B., Torri, G., Legramandi, M., & Righetti, P. G. (1982). Complexes of heparin with poly (alkylenimines): Competitive binding with methylene blue. *Carbohydrate Research*, 104(2), 299-308.

Cho, Y., Kim, H., & Kim, S. K. (2013). Bioethanol production from brown seaweed, *Undaria pinnatifida*, using NaCl acclimated yeast. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36, 713-719.

Chen, H., Zhou, D., Luo, G., Zhang, S., & Chen, J. (2015). Macroalgae for biofuels production: Progress and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 427-437.

Chauvierre, C., Aid-Launais, R., Aerts, J., Chaubet, F., Maire, M., Chollet, L., ... & Letourneur, D. (2019). Pharmaceutical development and safety evaluation of a GMP-grade fucoidan for molecular diagnosis of cardiovascular diseases. *Marine drugs*, 17(12), 699.

Chichibu, H., Yamagishi, K., Kishida, R., Maruyama, K., Hayama-Terada, M., Shimizu, Y., ... & Iso, H. (2021). Seaweed intake and risk of cardiovascular disease: The circulatory risk in communities study (CIRCS). *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 28(12), 1298-1306.

Croft, M. T., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2006). Algae need their vitamins. *Eukaryotic cell*, 5(8), 1175-1183.

Chandía, N. P., Matsuhira, B., Mejías, E., & Moenne, A. (2004). Alginic acids in *Lessonia vadosa*: partial hydrolysis and elicitor properties of the polymannuronic acid fraction. *Journal of Applied Phycology*, 16(2), 127-133.

Conforti, F., Statti, G., Loizzo, M. R., Sacchetti, G., Poli, F., & Menichini, F. (2005). In vitro antioxidant effect and inhibition of α -amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 28(6), 1098-1102.

Cudina, I., & Jovanović, S. V. (1988). Free radical inactivation of trypsin. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 32(3), 497-501.

Chen, X., Zhai, R., Li, Y., Yuan, X., Liu, Z. H., & Jin, M. (2020). Understanding the structural characteristics of water-soluble phenolic compounds from four pretreatments of corn stover and their inhibitory effects on enzymatic hydrolysis and fermentation. *Biotechnology for biofuels*, 13(1), 1-13.

Chakou, F. Z., Boual, Z., Hadj, M. D. O. E., Belkhalifa, H., Bachari, K., Alaoui-Talibi, E., ... & Michaud, P. (2021). Pharmacological Investigations in Traditional Utilization of *Alhagi maurorum* Medik. in Saharan Algeria: In Vitro Study of Anti-Inflammatory and Antihyperglycemic Activities of Water-Soluble Polysaccharides Extracted from the Seeds. *Plants*, 10(12), 2658.

Chandia, N. P., Matsuhira, B., & Vásquez, A. E. (2001). Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 46(1), 81-87.

Christophe, G., Deo, J. L., Kumar, V., Nouaille, R., Fontanille, P., & Larroche, C. (2012). Production of oils from acetic acid by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167, 1270-1279.

Chattopadhyay, N., Ghosh, T., Sinha, S., Chattopadhyay, K., Karmakar, P., & Ray, B. (2010). Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: Structural features and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 118(3), 823-829.

Chen, J., Hu, Y., Zhang, L., Wang, Y., Wang, S., Zhang, Y., ... & Wang, Y. (2017). Alginate oligosaccharide DP5 exhibits antitumor effects in osteosarcoma patients following surgery. *Frontiers in pharmacology*, 8, 623.

Conner, R. N., Rudolph, D. C., Saenz, D., & Schaefer, R. R. (1996). Red-cockaded Woodpecker nesting success, forest structure, and southern flying squirrels in Texas. *The Wilson Bulletin*, 697-711.

Chater, P. I., Wilcox, M. D., Brownlee, I. A., & Pearson, J. P. (2015). Alginate as a protease inhibitor in vitro and in a model gut system; selective inhibition of pepsin but not trypsin. *Carbohydrate Polymers*, 131, 142-151.

Corlett, R. T. (2016). Plant diversity in a changing world: status, trends, and conservation needs. *Plant diversity*, 38(1), 10-16.

Circuncisão, A. R., Catarino, M. D., Cardoso, S. M., & Silva, A. M. (2018). Minerals from macroalgae origin: Health benefits and risks for consumers. *Marine drugs*, 16(11), 400.

Cikoš, A. M., Šubarić, D., Roje, M., Babić, J., Jerković, I., & Jokić, S. (2022). Recent advances on macroalgal pigments and their biological activities (2016–2021). *Algal Research*, 65, 102748.

Chakraborty, K., Praveen, N. K., Vijayan, K. K., & Rao, G. S. (2013). Evaluation of phenolic contents and antioxidant activities of brown seaweeds belonging to *Turbinaria* spp.(Phaeophyta, Sargassaceae) collected from Gulf of Mannar. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(1), 8-16.

Cunha, L., & Grenha, A. (2016). Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. *Marine drugs*, 14(3), 42.

Chouana, T. (2017). *Caractérisation structurale et activités biologiques des polysaccharides d'Astragalus gombo bunge* (Doctoral dissertation, Université Clermont Auvergne (2017-2020)).

Choudhury, A., Sarma, S., Sarkar, S., Kumari, M., & Dey, B. K. (2022). Polysaccharides Obtained from Vegetables: an effective source of alternative excipient. *Journal of Pharmacopuncture*, 25(4), 317-325.

Couturier, M., Touvrety-Loiodice, M., Terrapon, N., Drula, E., Buon, L., Chirat, C., ... & Helbert, W. (2022). Functional exploration of the glycoside hydrolase family GH113. *Plos one*, 17(4), e0267509.

Cho, M., Lee, D. J., Kim, J. K., & You, S. (2014). Molecular characterization and immunomodulatory activity of sulfated fucans from *Agarum cribrosum*. *Carbohydrate polymers*, 113, 507-514.

Chevolot, L., Mulloy, B., Ratiskol, J., Foucault, A., & Collic-Jouault, S. (2001). A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydrate Research*, 330(4), 529-535.

Chang, Y. H., Chen, Y. L., Huang, W. C., & Liou, C. J. (2018). Fucoxanthin attenuates fatty acid-induced lipid accumulation in FL83B hepatocytes through regulated Sirt1/AMPK signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 495(1), 197-203.

Cheng, D., Ngo, H. H., Guo, W., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Bui, X. T., ... & Hoang, N. B. (2022). Enhanced photo-fermentative biohydrogen production from biowastes: An overview. *Bioresource Technology*, 127341.

Cristina Oliveira de Lima, V., Piuvezam, G., Leal Lima Maciel, B., & Heloneida de Araújo Morais, A. (2019). Trypsin inhibitors: promising candidate satietogenic proteins as complementary treatment for obesity and metabolic disorders?. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 34(1), 405-419.

Cassani, L., Lourenço-Lopes, C., Barral-Martinez, M., Chamorro, F., Garcia-Perez, P., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2022). Thermochemical characterization of eight seaweed species and evaluation of their potential use as an alternative for biofuel production and source of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2355.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.

Choudhary, D. K., & Mishra, A. (2017). In vitro and in silico interaction of porcine α -amylase with *Vicia faba* crude seed extract and evaluation of antidiabetic activity. *Bioengineered*, 8(4), 393-403.

Chandrasekaran, M., & Venkatesalu, V. (2004). Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *Journal of ethnopharmacology*, 91(1), 105-108.

Carter, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical biochemistry*, 40(2), 450-458.

Chen, H., Zhou, D., Luo, G., Zhang, S., & Chen, J. (2015). Macroalgae for biofuels production: Progress and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 427-437.

Cho, Y., Kim, H., & Kim, S. K. (2013). Bioethanol production from brown seaweed, *Undaria pinnatifida*, using NaCl acclimated yeast. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36, 713-719.

C. AGARDH on the in Vitro Cytopathic Activity of HIV-1 and It's Antigen Production. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 43(9), 1580-1584.

Castelain, C., Doublier, J. L., & Lefebvre, J. (1987). A study of the viscosity of cellulose derivatives in aqueous solutions. *Carbohydrate polymers*, 7(1), 1-16.

Cáceres, P. J., Carlucci, M. J., Damonte, E. B., Matsuhira, B., & Zúñiga, E. A. (2000). Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phylloporaceae): structural analysis and biological activity. *Phytochemistry*, 53(1), 81-86.

Caicedo-López, L. H., Aranda, A. L. V., Sáenz de la O, D., Gómez, C. E. Z., Márquez, E. E., & Zepeda, H. R. (2021). Elicitors: Bioethical implications for agriculture and human health. *Revista Bioética*, 29, 76-86.

Campo, V. L., & Kawano, D. F. da Silva Jr., DB; Carvalho, I. (2009) Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis-A review. *Carbohydrate polymers*, 77(2), 167-180.

Campos-Perez, W., & Martinez-Lopez, E. (2021). Effects of short chain fatty acids on metabolic and inflammatory processes in human health. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1866(5), 158900.

Cao, L. M., Sun, Z. X., Makale, E. C., Du, G. K., Long, W. F., & Huang, H. R. (2021). Antitumor activity of fucoidan: A systematic review and meta-analysis. *Translational Cancer Research*, 10(12), 5390.

Carlucci, M. J., Scolaro, L. A., Errea, M. I., Matulewicz, M. C., & Damonte, E. B. (1997). Antiviral activity of natural sulphated galactans on herpes virus multiplication in cell culture. *Planta medica*, 63(05), 429-432.

Carotenoids from Haloarchaea and their potential in biotechnology. *Marine drugs*, 13(9), 5508-5532.

Cervino, G., Fiorillo, L., Herford, A. S., Laino, L., Troiano, G., Amoroso, G., ... & Cicciù, M. (2018). Alginate materials and dental impression technique: A current state of the art and application to dental practice. *Marine drugs*, 17(1), 18.

Chen, K., & Roca, M. (2018). Cooking effects on chlorophyll profile of the main edible seaweeds. *Food chemistry*, 266, 368-374.

Cho, M. L., Lee, B. Y., & You, S. (2010). Relationship between oversulfation and conformation of low and high molecular weight fucoidans and evaluation of their in vitro anticancer activity. *Molecules*, 16(1), 291-297.

Choi, E. M., Kim, A. J., Kim, Y. O., & Hwang, J. K. (2005). Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan in vitro. *Journal of medicinal food*, 8(4), 446-453.

Ciancia, M., Quintana, I., Vizcargüénaga, M. I., Kasulin, L., de Dios, A., Estevez, J. M., & Cerezo, A. S. (2007). Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(5), 641-649.

Citkowska, A., Szekalska, M., & Winnicka, K. (2019). Possibilities of fucoidan utilization in the development of pharmaceutical dosage forms. *Marine drugs*, 17(8), 458.

Cikoš, A. M., Čož-Rakovac, R., Šubarić, D., Jerković, I., Ačkar, Đ., & Jokić, S. (2020). Macroalgae in the food industry—opportunities and challenges. *Engineering Power: Bulletin of the Croatian Academy of Engineering*, 15(3), 14-19.

Claus-Desbonnet, H., Nikly, E., Nalbantova, V., Karcheva-Bahchevanska, D., Ivanova, S., Pierre, G., ... & Delattre, C. (2022). Polysaccharides and their derivatives as potential antiviral molecules. *Viruses*, 14(2), 426.

Coura C.O., de Araújo I.W., Vanderlei E.S., Rodrigues J.A., Quinderé A.L., Fontes B.P., de Queiroz I.N., de Menezes D.B., Bezerra M.M., e Silva A.A., et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulphated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2012;**110**:335–341. doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00811.x.

Coutinho, A. J., Lima, S. A. C., Afonso, C. M., & Reis, S. (2020). Mucoadhesive and pH responsive fucoidan-chitosan nanoparticles for the oral delivery of methotrexate. *International journal of biological macromolecules*, 158, 180-188.

Cui, M., Li, X., Geng, L., Wu, N., Wang, J., Deng, Z., ... & Zhang, Q. (2022). Comparative study of the immunomodulatory effects of different fucoidans from *Saccharina japonica* mediated by scavenger receptors on RAW 264.7 macrophages. *International Journal of Biological Macromolecules*, 215, 253-261.

Dutot, M., Olivier, E., Fouyet, S., Magny, R., Hammad, K., Roulland, E., ... & Fagon, R. (2021). In Vitro chemopreventive potential of phlorotannins-rich extract from brown algae by inhibition of benzo [a] pyrene-induced P2x7 activation and toxic effects. *Marine drugs*, 19(1), 34.

Dore, C. M. P. G., Alves, M. G. D. C. F., Will, L. S. E. P., Costa, T. G., Sabry, D. A., de Souza Rêgo, L. A. R., ... & Leite, E. L. (2013). A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. *Carbohydrate polymers*, 91(1), 467-475.

Drira, M., Hentati, F., Babich, O., Sukhikh, S., Larina, V., Sharifian, S., ... & Michaud, P. (2021). Bioactive carbohydrate polymers—between myth and reality. *Molecules*, 26(23), 7068.

De Sousa, A. A., Benevides, N. M., de Freitas Pires, A., Fiúza, F. P., Queiroz, M. G., Morais, T. M., ... & Assreuy, A. M. (2013). A report of a galactan from marine alga *Gelidium crinale* with in vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects. *Fundamental & clinical pharmacology*, 27(2), 173-180.

Dinesh, S., Menon, T., Hanna, L. E., Suresh, V., Sathuvan, M., & Manikannan, M. (2016). In vitro anti-HIV-1 activity of fucoidan from *Sargassum swartzii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 83-88.

Dharmadeva, S., Galgamuwa, L. S., Prasadinie, C., & Kumarasinghe, N. (2018). In vitro anti-inflammatory activity of *Ficus racemosa* L. bark using albumin denaturation method. *Ayu*, 39(4), 239.

Dankowska, A., & Małecka, M. (2009). Application of synchronous fluorescence spectroscopy for determination of extra virgin olive oil adulteration. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(12), 1233-1239.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

Dodgson, K. S., & Price, R. G. (1962). A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochemical Journal*, 84(1), 106.

Delattre, C., Pierre, G., Gardarin, C., Traïkia, M., Elboutachfaiti, R., Isogai, A., & Michaud, P. (2015). Antioxidant activities of a polyglucuronic acid sodium salt obtained from TEMPO-mediated oxidation of xanthan. *Carbohydrate Polymers*, 116, 34-41.

Davis, T. A., Ramirez, M., Mucci, A., & Larsen, B. (2004). Extraction, isolation and cadmium binding of alginate from *Sargassum* spp. *Journal of applied phycology*, 16, 275-284.

Delattre, C., Fenoradosoa, T. A., & Michaud, P. (2011). Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, 1075-1092.

Duarte, M. E., Cardoso, M. A., Nosedá, M. D., & Cerezo, A. S. (2001). Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydrate Research*, 333(4), 281-293.

Dávila, J. L., & d'Ávila, M. A. (2017). Laponite as a rheology modifier of alginate solutions: Physical gelation and aging evolution. *Carbohydrate polymers*, 157, 1-8.

Daub, C. D., Mabate, B., Malgas, S., & Pletschke, B. I. (2020). Fucoidan from *Ecklonia maxima* is a powerful inhibitor of the diabetes-related enzyme, α -glucosidase. *International journal of biological macromolecules*, 151, 412-420.

Dommermuth, R., & Ewing, K. (2018). Metabolic syndrome: systems thinking in heart disease. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 45(1), 109-129.

Del Río, P. G., Gomes-Dias, J. S., Rocha, C. M., Romaní, A., Garrote, G., & Domingues, L. (2020). Recent trends on seaweed fractionation for liquid biofuels production. *Bioresource technology*, 299, 122613.

Daroch, M., Geng, S., & Wang, G. (2013). Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Applied Energy*, 102, 1371-1381.

De Sousa Oliveira Vanderlei, E., de Araújo, I. W. F., Quinderé, A. L. G., Fontes, B. P., Eloy, Y. R. G., Rodrigues, J. A. G., ... & Benevides, N. M. B. (2011). The involvement of the

HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Inflammation Research*, 60, 1121-1130.

Donati, I., & Paoletti, S. (2009). Material properties of alginates. *Alginates: biology and applications*, 1-53.

De Silva, S. S. M., & Kumar, N. S. (1984). Carbohydrate constituents of the marine algae of Sri Lanka part ii.: composition and sequence of uronate residues in alginates from some brown seaweeds.

Duarte, M. E., Cardoso, M. A., Nosedá, M. D., & Cerezo, A. S. (2001). Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydrate Research*, 333(4), 281-293.

De Clercq, E. (2000). Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Medicinal research reviews*, 20(5), 323-349.

Doner, L. W., & Irwin, P. L. (1992). Assay of reducing end-groups in oligosaccharide homologues with 2, 2'-bicinchoninate. *Analytical biochemistry*, 202(1), 50-53.

Dayhim, M., Jafari, M. A., & Mazurek, M. (2014). Planning sustainable hydrogen supply chain infrastructure with uncertain demand. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(13), 6789-6801.

Dahlén, A. D., Dashi, G., Maslov, I., Attwood, M. M., Jonsson, J., Trukhan, V., & Schiöth, H. B. (2022). Trends in antidiabetic drug discovery: FDA approved drugs, new drugs in clinical trials and global sales. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 4119.

Dammer, L., Carus, M., Piotrowski, S., Puente, Á., Breitmayer, E., Beus, N. D., & Liptow, C. (2017). Sustainable first and second-generation bioethanol for Europe: a sustainability assessment in the context of the European Commission's REDII proposal. *Industrial Biotechnology*, 13(6), 292-300.

De Melo, K. D. C. M., Lisboa, L. D. S., Queiroz, M. F., Paiva, W. S., Luchiari, A. C., Camara, R. B. G., ... & Rocha, H. A. O. (2022). Antioxidant Activity of Fucoidan Modified with Gallic Acid Using the Redox Method. *Marine Drugs*, 20(8), 490.

De, C. E. (2000). Current lead natural product for chemotherapy of HIV infection. *Med Res Rev*, 20, 323-349.

Desender, S., Andrivon, D., & Val, F. (2007). Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity?. *Cellular microbiology*, 9(1), 21-30.

Dey, P., Ramanujam, R., Venkatesan, G., & Nagarathnam, R. (2019). Sodium alginate potentiates antioxidant defense and PR proteins against early blight disease caused by *Alternaria solani* in *Solanum lycopersicum* Linn. *PLoS One*, 14(9), e0223216.

Din, N. A. S., Mohd Alayudin, A. S., Sofian-Seng, N. S., Rahman, H. A., Mohd Razali, N. S., Lim, S. J., & Wan Mustapha, W. A. (2022). Brown Algae as Functional Food Source of Fucoxanthin: A Review. *Foods*, 11(15), 2235.

Duan, Y., Li, J., Jing, X., Ding, X., Yu, Y., & Zhao, Q. (2020). Fucoidan induces apoptosis and inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma via the p38 MAPK/ERK and PI3K/Akt signal pathways. *Cancer Management and Research*, *12*, 1713.

Duarte M.E., Cardoso M.A., Nosedá M.D., Cerezo A.S. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydr. Res.* 2001;**333**:281–293. doi: 10.1016/S0008-6215(01)00149-5.

Duarte, M. E., Cardoso, M. A., Nosedá, M. D., & Cerezo, A. S. (2001). Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydrate Research*, *333*(4), 281-293.

El-Beltagi, H. S., Mohamed, A. A., Mohamed, H. I., Ramadan, K. M., Barqawi, A. A., & Mansour, A. T. (2022). Phytochemical and potential properties of seaweeds and their recent applications: A review. *Marine Drugs*, *20*(6), 342.

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., ... & Woutersen, R. A. (2018). Re-evaluation of aluminium sulphates (E 520–523) and sodium aluminium phosphate (E 541) as food additives. *EFSA Journal*, *16*(7), e05372.

Endo, H., Sugie, T., Yonemori, Y., Nishikido, Y., Moriyama, H., Ito, R., & Okunishi, S. (2021). Vegetative reproduction is more advantageous than sexual reproduction in a canopy-forming clonal macroalga under ocean warming accompanied by oligotrophication and intensive herbivory. *Plants*, *10*(8), 1522.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Turck, D., Bresson, J. L., Burlingame, B., Dean, T., Fairweather-Tait, S., ... & van Loveren, H. (2017). Safety of hydroxytyrosol as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97. *EFSA Journal*, *15*(3), e04728.

Elbayomi, S. M., Wang, H., Tamer, T. M., & You, Y. (2021). Enhancement of antioxidant and hydrophobic properties of alginate via aromatic derivatization: Preparation, characterization, and evaluation. *Polymers*, *13*(15), 2575.

El Modafar, C., Elgadda, M., El Boutachfaiti, R., Abouraicha, E., Zehhar, N., Petit, E., ... & Courtois, J. (2012). Induction of natural defence accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. *Scientia Horticulturae*, *138*, 55-63.

Ermakova, S., Men'shova, R., Vishchuk, O., Kim, S. M., Um, B. H., Isakov, V., & Zvyagintseva, T. (2013). Water-soluble polysaccharides from the brown alga *Eisenia bicyclis*: Structural characteristics and antitumor activity. *Algal Research*, *2*(1), 51-58.

Elleuch, J., Hmani, R., Drira, M., Michaud, P., Fendri, I., & Abdelkafi, S. (2021). Potential of three local marine microalgae from Tunisian coasts for cadmium, lead and chromium removals. *Science of The Total Environment*, *799*, 149464.

El-Beltagi, H. S., El-Senousi, N. A., Ali, Z. A., & Omran, A. A. (2017). The impact of using chickpea flour and dried carp fish powder on pizza quality. *PloS one*, 12(9), e0183657.

Elleuch, J., Kacem, F. H., Amor, F. B., Hadrich, B., Michaud, P., Fendri, I., & Abdelkafi, S. (2021). Extracellular neutral protease from *Arthrospira platensis*: Production, optimization and partial characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 1491-1498.

Escribano, M., & Mesías, F. J. (2023). Ethical aspects of meat alternative products. In *Meat and Meat Replacements* (pp. 225-255). Woodhead Publishing.

El Modafar, C., Elgadda, M., El Boutachfaiti, R., Abouraicha, E., Zehhar, N., Petit, E., ... & Courtois, J. (2012). Induction of natural defence accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. *Scientia Horticulturae*, 138, 55-63.

Elleuch, J., Zghal, R. Z., Fguira, I. B., Lacroix, M. N., Suissi, J., Chandre, F., ... & Jaoua, S. (2015). Effects of the P20 protein from *Bacillus thuringiensis israelensis* on insecticidal crystal protein Cry4Ba. *International journal of biological macromolecules*, 79, 174-179.

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Filipič, M., ... & Dusemund, B. (2018). Re-evaluation of carrageenan (E 407) and processed *Eucheuma* seaweed (E 407a) as food additives. *EFSA Journal*, 16(4), e05238.

Eker, S., & Sarp, M. (2017). Hydrogen gas production from waste paper by dark fermentation: effects of initial substrate and biomass concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(4), 2562-2568.

Ejima, R., Akiyama, M., Sato, H., Tomioka, S., Yakabe, K., Kimizuka, T., ... & Kim, Y. G. (2021). Seaweed dietary fiber sodium alginate suppresses the migration of colonic inflammatory monocytes and diet-induced metabolic syndrome via the gut microbiota. *Nutrients*, 13(8), 2812.

Ebrahimzadeh, S., Biswas, D., Roy, S., & McClements, D. J. (2023). Incorporation of essential oils in edible seaweed-based films: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*.

Elboutachfaiti, R., Delattre, C., Petit, E., & Michaud, P. (2011). Polyglucuronic acids: structures, functions and degrading enzymes. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 1-13.

Fleurence, J. (1999). Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in food science & technology*, 10(1), 25-28.

Fleurence, J., Morançais, M., & Dumay, J. (2018). Proteins in food processing. *Seaweed proteins*, 245-262.

Fry, S. C., Nesselrode, B. H., Miller, J. G., & Mewburn, B. R. (2008). Mixed-linkage (1→3, 1→4)-β-d-glucan is a major hemicellulose of *Equisetum* (horsetail) cell walls. *New Phytologist*, 179(1), 104-115.

- FAO. 2014. Fishery and Aquaculture Statistics 2012. Rome.
- Fedorov, S. N., Ermakova, S. P., Zvyagintseva, T. N., & Stonik, V. A. (2013). Anticancer and cancer preventive properties of marine polysaccharides: Some results and prospects. *Marine drugs*, 11(12), 4876-4901.
- Fry, S. C., Nesselrode, B. H., Miller, J. G., & Mewburn, B. R. (2008). Mixed-linkage (1→3, 1→4)-β-d-glucan is a major hemicellulose of Equisetum (horsetail) cell walls. *New Phytologist*, 179(1), 104-115.
- Fernando, I. P. S., Lee, W., Han, E. J., & Ahn, G. (2020). Alginate-based nanomaterials: Fabrication techniques, properties, and applications. *Chemical Engineering Journal*, 391, 123823.
- Feldmann, J. (1931). Note sur quelques algues marines de Tunisie.
- Flórez-Fernández, N., Balboa, E. M., & Domínguez, H. (2020). Extraction and purification of fucoidan from marine sources. *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, 2, 1093-1125.
- Fernando, I. P. S., Lee, W., Han, E. J., & Ahn, G. (2020). Alginate-based nanomaterials: Fabrication techniques, properties, and applications. *Chemical Engineering Journal*, 391, 123823.
- Faisal, S., Zaky, A., Wang, Q., Huang, J., & Abomohra, A. (2022). Integrated Marine Biogas: A Promising Approach towards Sustainability. *Fermentation*, 8(10), 520.
- Fenoradosoa, T. A., Ali, G., Delattre, C., Laroche, C., Petit, E., Wadouachi, A., & Michaud, P. (2010). Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed *Sargassum turbinarioides* Grunow. *Journal of applied phycology*, 22, 131-137.
- Fourest, E., & Volesky, B. (1997). Alginate properties and heavy metal biosorption by marine algae. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 67, 215-226.
- Fauziee, N. A. M., Chang, L. S., Mustapha, W. A. W., Nor, A. R. M., & Lim, S. J. (2021). Functional polysaccharides of fucoidan, laminaran and alginate from Malaysian brown seaweeds (*Sargassum polycystum*, *Turbinaria ornata* and *Padina boryana*). *International journal of biological macromolecules*, 167, 1135-1145.
- Farias, E. H., Pomin, V. H., Valente, A. P., Nader, H. B., Rocha, H. A., & Mourao, P. A. (2008). A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. *Glycobiology*, 18(3), 250-259.
- Fujihara, M., & Nagumo, T. (1992). The effect of the content of D-mannuronic acid and L-guluronic acid blocks in alginates on antitumor activity. *Carbohydrate research*, 224, 343-347.
- Fujihara, M., & Nagumo, T. (1993). An influence of the structure of alginate on the chemotactic activity of macrophages and the antitumor activity. *Carbohydrate research*, 243(1), 211-216.

Fawzy, M. A., & Gomaa, M. (2021). Optimization of citric acid treatment for the sequential extraction of fucoidan and alginate from *Sargassum latifolium* and their potential antioxidant and Fe (III) chelation properties. *Journal of Applied Phycology*, *33*, 2523-2535.

Falkeborg, M., Cheong, L. Z., Gianfico, C., Sztukiel, K. M., Kristensen, K., Glasius, M., ... & Guo, Z. (2014). Alginate oligosaccharides: Enzymatic preparation and antioxidant property evaluation. *Food chemistry*, *164*, 185-194.

Fawzy, M. A., Gomaa, M., Hifney, A. F., & Abdel-Gawad, K. M. (2017). Optimization of alginate alkaline extraction technology from *Sargassum latifolium* and its potential antioxidant and emulsifying properties. *Carbohydrate polymers*, *157*, 1903-1912.

Fan, L., Jiang, L., Xu, Y., Zhou, Y., Shen, Y., Xie, W., ... & Zhou, J. (2011). Synthesis and anticoagulant activity of sodium alginate sulfates. *Carbohydrate polymers*, *83*(4), 1797-1803.

Fung, A., Hamid, N., & Lu, J. (2013). Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food chemistry*, *136*(2), 1055-1062.

Foo, S. C., Yusoff, F. M., Ismail, M., Basri, M., Yau, S. K., Khong, N. M., ... & Ebrahimi, M. (2017). HPLC fucoxanthin profiles of a microalga, a macroalga and a pure fucoxanthin standard. *Data in brief*, *10*, 583-586.

Fasahati, P., & Liu, J. J. (2012). Process simulation of bioethanol production from brown algae. *IFAC Proceedings Volumes*, *45*(15), 597-602.

Fei, Q., Chang, H. N., Shang, L., Kim, N., & Kang, J. (2011). The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresource technology*, *102*(3), 2695-2701.

Fontanille, P., Kumar, V., Christophe, G., Nouaille, R., & Larroche, C. (2012). Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource technology*, *114*, 443-449.

Gülcin, İ. (2006). Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life sciences*, *78*(8), 803-811.

Ghorani, B., Naji-Tabasi, S., Bostan, A., & Emadzadeh, B. (2018). Application of Nanotechnology in the Safe Delivery of Bioactive Compounds. In *Nanotechnology Applications in the Food Industry* (pp. 237-291). CRC Press.

Gotteland, M., Riveros, K., Gasaly, N., Carcamo, C., Magne, F., Liabeuf, G., ... & Rosenfeld, S. (2020). The pros and cons of using algal polysaccharides as prebiotics. *Frontiers in Nutrition*, *7*, 163.

Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Šimat, V., Hamed, I., Čagalj, M., & Popović Perković, Z. (2019). Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification. *Biomolecules*, *9*(6), 244.

Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 315-326.

Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M. Ü. N. E. V. V. E. R., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A. T. A. L. A. Y., ... & Ozkan, H. İ. C. A. B. İ. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food chemistry*, 103(4), 1449-1456.

Goñi, I., Valdivieso, L., & Gudiel-Urbano, M. (2002). Capacity of edible seaweeds to modify in vitro starch digestibility of wheat bread. *Food/Nahrung*, 46(1), 18-20.

Gebregziabher, B. S., Zhang, S., Qi, J., Azam, M., Ghosh, S., Feng, Y., ... & Sun, J. (2021). Simultaneous determination of carotenoids and chlorophylls by the HPLC-UV-VIS method in soybean seeds. *Agronomy*, 11(4), 758.

Gunathilaka, T. L., Samarakoon, K., Ranasinghe, P., & Peiris, L. D. C. (2020). Antidiabetic potential of marine brown algae—a mini review. *Journal of diabetes research*, 2020.

Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Šimat, V., Hamed, I., Čagalj, M., & Popović Perković, Z. (2019). Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification. *Biomolecules*, 9(6), 244.

Ganesan, A. R., Tiwari, U., & Rajauria, G. (2019). Seaweed nutraceuticals and their therapeutic role in disease prevention. *Food Science and Human Wellness*, 8(3), 252-263.

Gaudet, G., Forano, E., Dauphin, G., & DELORT, A. M. (1992). Futile cycling of glycogen in *Fibrobacter succinogenes* as shown by in situ ¹H-NMR and ¹³C-NMR investigation. *European journal of biochemistry*, 207(1), 155-162.

Grasdalen, H. (1983). High-field, ¹H-nmr spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. *Carbohydrate Research*, 118, 255-260.

Ghosh, S. B., & Chandra, A. K. (1981). Production of thermostable alpha amylase by *Bacillus Apiarius* CBML 152. In *Fermentation Products* (pp. 313-321). Pergamon.

Ghosh, T., Chattopadhyay, K., Marschall, M., Karmakar, P., Mandal, P., & Ray, B. (2009). Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure–activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology*, 19(1), 2-15.

Geadá, P., Moreira, C., Silva, M., Nunes, R., Madureira, L., Rocha, C. M., ... & Teixeira, J. A. (2021). Algal proteins: Production strategies and nutritional and functional properties. *Bioresource Technology*, 332, 125125.

Godínez-Ortega, J. L., Cuatlán-Cortés, J. V., López-Bautista, J. M., & van Tussenbroek, B. I. (2021). A Natural history of floating *Sargassum* species (Sargasso) from Mexico. In *Natural History and Ecology of Mexico and Central America* (p. 35). London, UK: IntechOpen.

Garon-Lardière, S. (2004). *Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge Asparagopsis armata (Bonnemaisoniales)* (Doctoral dissertation, Université de Bretagne Occidentale).

García-Ferrer, L., Galicia-García, C., Okolodkov, Y., & Herrera-Silveira, J. A. (2019). *Halopteris filicina (PHAEOPHYCEAE: SPHACELARIALES), A NEW RECORD FOR MEXICO. CICIMAR Océánides, 34(2).*

Güven, K. C., Percot, A., & Sezik, E. (2010). Alkaloids in marine algae. *Marine Drugs, 8(2)*, 269-284.

García-Poza, S., Leandro, A., Cotas, C., Cotas, J., Marques, J. C., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. (2020). The evolution road of seaweed aquaculture: cultivation technologies and the industry 4.0. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(18)*, 6528.

Gacesa, P. (1988). Alginates. *Carbohydrate polymers, 8(3)*, 161-182.

Gotteland, M., Riveros, K., Gasaly, N., Carcamo, C., Magne, F., Liabeuf, G., ... & Rosenfeld, S. (2020). The pros and cons of using algal polysaccharides as prebiotics. *Frontiers in Nutrition, 7*, 163.

Gomaa, M., Hifney, A. F., Fawzy, M. A., & Abdel-Gawad, K. M. (2018). Use of seaweed and filamentous fungus derived polysaccharides in the development of alginate-chitosan edible films containing fucoidan: Study of moisture sorption, polyphenol release and antioxidant properties. *Food hydrocolloids, 82*, 239-247.

Ge, J., Yue, P., Chi, J., Liang, J., & Gao, X. (2018). Formation and stability of anthocyanins-loaded nanocomplexes prepared with chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan. *Food Hydrocolloids, 74*, 23-31.

Getachew, A. T., Holdt, S. L., Meyer, A. S., & Jacobsen, C. (2022). Effect of extraction temperature on pressurized liquid extraction of bioactive compounds from *Fucus vesiculosus*. *Marine Drugs, 20(4)*, 263.

Gotteland, M., Riveros, K., Gasaly, N., Carcamo, C., Magne, F., Liabeuf, G., ... & Rosenfeld, S. (2020). The pros and cons of using algal polysaccharides as prebiotics. *Frontiers in Nutrition, 7*, 163.

Gumus, R. E. C. E. P., Gelen, S. U., Koseoglu, S., Ozkanlar, S., Ceylan, Z. G., & Imik, H. (2018). The effects of fucoxanthin dietary inclusion on the growth performance, antioxidant metabolism and meat quality of broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science, 20*, 487-496.

Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology, 22(6)*, 315-326.

Gammone, M. A., & D'Orazio, N. (2015). Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin. *Marine drugs, 13(4)*, 2196-2214.

Ghedini, E., Taghavi, S., Menegazzo, F., & Signoreto, M. (2021). A Review on the Efficient Catalysts for Algae Transesterification to Biodiesel. *Sustainability, 13(18)*, 10479.

Gong, L., Feng, D., Wang, T., Ren, Y., Liu, Y., & Wang, J. (2020). Inhibitors of α -amylase and α -glucosidase: Potential linkage for whole cereal foods on prevention of hyperglycemia. *Food science & nutrition*, 8(12), 6320-6337.

Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(4), 600-609.

Ge, J., Yue, P., Chi, J., Liang, J., & Gao, X. (2018). Formation and stability of anthocyanins-loaded nanocomplexes prepared with chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan. *Food Hydrocolloids*, 74, 23-31.

Georg Jensen, M., Kristensen, M., & Astrup, A. (2012). Effect of alginate supplementation on weight loss in obese subjects completing a 12-wk energy-restricted diet: a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*, 96(1), 5-13.

Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111(7), 927-930.

Guo, L., Goff, H. D., Xu, F., Liu, F., Ma, J., Chen, M., & Zhong, F. (2020). The effect of sodium alginate on nutrient digestion and metabolic responses during both in vitro and in vivo digestion process. *Food Hydrocolloids*, 107, 105304.

GV, Y. D., Nagendra, A. H., Shenoy, S., Chatterjee, K., & Venkatesan, J. (2022). Isolation and purification of fucoidan from *Sargassum ilicifolium*: Osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 136, 104418.

Healy, L. E., Zhu, X., Pojić, M., Sullivan, C., Tiwari, U., Curtin, J., & Tiwari, B. K. (2023). Biomolecules from Macroalgae—Nutritional Profile and Bioactives for Novel Food Product Development. *Biomolecules*, 13(2), 386.

Hu, P., Li, Z., Chen, M., Sun, Z., Ling, Y., Jiang, J., & Huang, C. (2016). Structural elucidation and protective role of a polysaccharide from *Sargassum fusiforme* on ameliorating learning and memory deficiencies in mice. *Carbohydrate Polymers*, 139, 150-158.

Hoek, C., Mann, D., Jahns, H. M., & Jahns, M. (1995). *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge university press.

Hans, N., Malik, A., & Naik, S. (2021). Antiviral activity of sulfated polysaccharides from marine algae and its application in combating COVID-19: Mini review. *Bioresource technology reports*, 13, 100623.

Hrólfssdóttir, A. Þ., Arason, S., Sveinsdóttir, H. I., & Guðjónsdóttir, M. (2022). Added Value of *Ascophyllum nodosum* Side Stream Utilization during Seaweed Meal Processing. *Marine Drugs*, 20(6), 340.

Hentati, F., Delattre, C., Ursu, A. V., Desbrières, J., Le Cerf, D., Gardarin, C., ... & Pierre, G. (2018). Structural characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides

from the Tunisian brown seaweed *Cystoseira compressa*. *Carbohydrate polymers*, 198, 589-600.

Harholt, J., Suttangkakul, A., & Vibe Scheller, H. (2010). Biosynthesis of pectin. *Plant physiology*, 153(2), 384-395.

Häder, D. P. (2018). Mid-latitude macroalgae. In *Aquatic Ecosystems in a Changing Climate* (pp. 227-251). CRC Press.

Hwang, H. J., Kim, S. W., Xu, C. P., Choi, J. W., & Yun, J. W. (2003). Production and molecular characteristics of four groups of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus gilvus*. *Journal of applied microbiology*, 94(4), 708-719.

Hadj Ammar, F. (2016). Caractérisation des eaux de l'aquifère du complexe terminal: approche multi-isotopiques ($^{234}\text{U}/^{238}\text{U}$, ^{36}Cl , ^{14}C , $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^2\text{H}$) (Doctoral dissertation, Aix-Marseille).

Hassan, R., Zaaferany, I., Gobouri, A., & Takagi, H. (2013). A revisit to the corrosion inhibition of aluminum in aqueous alkaline solutions by water-soluble alginates and pectates as anionic polyelectrolyte inhibitors. *International Journal of Corrosion*, 2013.

Hentati, F., Pierre, G., Ursu, A. V., Vial, C., Delattre, C., Abdelkafi, S., & Michaud, P. (2020). Rheological investigations of water-soluble polysaccharides from the Tunisian brown seaweed *Cystoseira compressa*. *Food Hydrocolloids*, 103, 105631.

Hwang, P. A., Hung, Y. L., Tsai, Y. K., Chien, S. Y., & Kong, Z. L. (2015). The brown seaweed *Sargassum hemiphyllum* exhibits α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity and enhances insulin release in vitro. *Cytotechnology*, 67, 653-660.

Hou, X., Hansen, J. H., & Bjerre, A. B. (2015). Integrated bioethanol and protein production from brown seaweed *Laminaria digitata*. *Bioresource technology*, 197, 310-317.

Hay, C. H. (1990). The distribution of *Macrocystis* (Phaeophyta: Laminariales) as a biological indicator of cool sea surface temperature, with special reference to New Zealand waters. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 20(4), 313-336.

Hentati, F., Delattre, C., Gardarin, C., Desbrières, J., Le Cerf, D., Rihouey, C., ... & Pierre, G. (2020). Structural features and rheological properties of a sulfated Xylogalactan-rich fraction isolated from Tunisian red seaweed *Jania adhaerens*. *Applied Sciences*, 10(5), 1655.

Hendrikse, N. M., Holmberg Larsson, A., Svensson Gelius, S., Kuprin, S., Nordling, E., & Syrén, P. O. (2020). Exploring the therapeutic potential of modern and ancestral phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases as supplementary treatment of hereditary tyrosinemia. *Scientific Reports*, 10(1), 1315.

Hussein, M. M. D., Abdel-Aziz, A., & Salem, H. M. (1980). Sulphated heteropolysaccharides from *Padina pavonia*. *Phytochemistry*, 19(10), 2131-2132.

Huang, Y. C., & Kuo, T. H. (2016). O-carboxymethyl chitosan/fucoidan nanoparticles increase cellular curcumin uptake. *Food Hydrocolloids*, 53, 261-269.

Higuchi, K., Saito, I., Maruyama, K., Eguchi, E., Mori, H., Tanno, S., ... & Tanigawa, T. (2015). Associations of serum β -carotene and retinol concentrations with insulin resistance: The Toon Health Study. *Nutrition*, 31(7-8), 975-980.

Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J. S. (2013). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource technology*, 135, 191-198.

Hay, J. X. W., Wu, T. Y., Juan, J. C., & Md. Jahim, J. (2013). Biohydrogen production through photo fermentation or dark fermentation using waste as a substrate: overview, economics, and future prospects of hydrogen usage. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 7(3), 334-352.

Hasselström, L., Visch, W., Gröndahl, F., Nylund, G. M., & Pavia, H. (2018). The impact of seaweed cultivation on ecosystem services-a case study from the west coast of Sweden. *Marine Pollution Bulletin*, 133, 53-64.

Hadjkacem, F., Pierre, G., Christophe, G., Elleuch, J., Fendri, I., Boual, Z., ... & Abdelkafi, S. (2022). Bioconversion of the Brown Tunisian Seaweed *Halopteris scoparia*: Application to Energy. *Energies*, 15(12), 4342.

Hentati, F., Tounsi, L., Djomdi, D., Pierre, G., Delattre, C., Ursu, A. V., ... & Michaud, P. (2020). Bioactive polysaccharides from seaweeds. *Molecules*, 25(14), 3152.

Hifney, A. F., Fawzy, M. A., Abdel-Gawad, K. M., & Gomaa, M. (2016). Industrial optimization of fucoidan extraction from *Sargassum* sp. and its potential antioxidant and emulsifying activities. *Food hydrocolloids*, 54, 77-88.

Hoang, N. N., Nguyen, T. K., Vo, T. H., Nguyen, N. H., Nguyen, D. H., & Tran, D. L. (2022). Isolation, Characterization, and Biological Activities of Fucoidan Derived from *Ceratophyllum Submersum* L. *Macromolecular Research*, 30(2), 136-145.

Hadj Ammar, H., Lajili, S., Ben Said, R., Le Cerf, D., Bouraoui, A., & Majdoub, H. (2015). Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation of sulfated polysaccharides from three species of Mediterranean brown algae of the genus *Cystoseira*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23, 1-8.

Haijin, M., Xiaolu, J., & Huashi, G. (2003). A κ -carrageenan derived oligosaccharide prepared by enzymatic degradation containing anti-tumor activity. *Journal of Applied Phycology*, 15, 297-303.

Hayashi, K., Nakano, T., Hashimoto, M., Kanekiyo, K., & Hayashi, T. (2008). Defensive effects of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection. *International immunopharmacology*, 8(1), 109-116.

Hentati, F., Tounsi, L., Djomdi, D., Pierre, G., Delattre, C., Ursu, A. V., ... & Michaud, P. (2020). Bioactive polysaccharides from seaweeds. *Molecules*, 25(14), 3152.

Hoffman, R., Paper, D. H., Donaldson, J., Alban, S., & Franz, G. (1995). Characterisation of a laminarin sulphate which inhibits basic fibroblast growth factor binding and endothelial cell proliferation. *Journal of cell science*, 108(11), 3591-3598.

Houghton, D., Wilcox, M. D., Chater, P. I., Brownlee, I. A., Seal, C. J., & Pearson, J. P. (2015). Biological activity of alginate and its effect on pancreatic lipase inhibition as a potential treatment for obesity. *Food Hydrocolloids*, 49, 18-24.

Hu, X., Jiang, X., Hwang, H., Liu, S., & Guan, H. (2004). Promotive effects of alginate-derived oligosaccharide on maize seed germination. *Journal of applied phycology*, 16, 73-76.

Huang, J., Huang, J., Li, Y., Wang, Y., Wang, F., Qiu, X., ... & Li, H. (2021). Sodium alginate modulates immunity, intestinal mucosal barrier function, and gut microbiota in cyclophosphamide-induced immunosuppressed BALB/c mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(25), 7064-7073.

International Organization for Standardization. (2014). *Medical laboratories: requirements for quality and competence*. ISO.

Ihse, I., Lundquist, I., & Arnesjö, B. (1976). Oral trypsin-inhibitor-induced improvement of the exocrine and endocrine pancreatic functions in alloxan diabetic rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 11(4), 363-368.

IEA, I. (2020). Energy technology perspectives 2020. International Energy Agency.

Iwamoto, M., Kurachi, M., Nakashima, T., Kim, D., Yamaguchi, K., Oda, T., ... & Muramatsu, T. (2005). Structure–activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264. 7 cells. *FEBS letters*, 579(20), 4423-4429.

Jönsson, M., Allahgholi, L., Sardari, R. R., Hreggviðsson, G. O., & Nordberg Karlsson, E. (2020). Extraction and modification of macroalgal polysaccharides for current and next-generation applications. *Molecules*, 25(4), 930.

John, D. M. (1994). Biodiversity and conservation: an algal perspective. *The phycologist*, 38, 3-15.

Jaswir, I., Noviendri, D., Salleh, H. M., Taher, M., Miyashita, K., & Ramli, N. (2013). Analysis of fucoxanthin content and purification of all-trans-fucoxanthin from *Turbinaria turbinata* and *Sargassum plagyophyllum* by SiO₂ open column chromatography and reversed phase-HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 36(10), 1340-1354.

Jaswir, I., Noviendri, D., Salleh, H. M., & Miyashita, K. (2012). Fucoxanthin extractions of brown seaweeds and analysis of their lipid fraction in methanol. *Food Science and Technology Research*, 18(2), 251-257.

Jeliani, Z. Z., Fazelian, N., & Yousefzadi, M. (2021). Introduction of macroalgae as a source of biodiesel in Iran: Analysis of total lipid content, fatty acid and biodiesel indices. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 101(3), 527-534.

Jönsson, M., Allahgholi, L., Sardari, R. R., Hreggviðsson, G. O., & Nordberg Karlsson, E. (2020). Extraction and modification of macroalgal polysaccharides for current and next-generation applications. *Molecules*, 25(4), 930.

Jung, M., Park, M., Lee, H. C., Kang, Y. H., Kang, E. S., & Kim, S. K. (2006). Antidiabetic agents from medicinal plants. *Current medicinal chemistry*, 13(10), 1203-1218.

Jambo, S. A., Abdulla, R., Azhar, S. H. M., Marbawi, H., Gansau, J. A., & Ravindra, P. (2016). A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and sustainable energy reviews*, 65, 756-769.

Jang, J. S., Cho, Y., Jeong, G. T., & Kim, S. K. (2012). Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35, 11-18.

Jafari, M., Sriram, V., Xu, Z., Harris, G. M., & Lee, J. Y. (2020). Fucoidan-doxorubicin nanoparticles targeting p-selectin for effective breast cancer therapy. *Carbohydrate polymers*, 249, 116837.

Jönsson, M., Allahgholi, L., Sardari, R. R., Hreggviðsson, G. O., & Nordberg Karlsson, E. (2020). Extraction and modification of macroalgal polysaccharides for current and next-generation applications. *Molecules*, 25(4), 930.

Jayawardena, T. U., Nagahawatta, D. P., Fernando, I. P. S., Kim, Y. T., Kim, J. S., Kim, W. S., ... & Jeon, Y. J. (2022). A Review on fucoidan structure, extraction techniques, and its role as an immunomodulatory agent. *Marine Drugs*, 20(12), 755.

Jeong, H. J., Lee, S. A., Moon, P. D., Na, H. J., Park, R. K., Um, J. Y., ... & Hong, S. H. (2006). Alginic acid has anti-anaphylactic effects and inhibits inflammatory cytokine expression via suppression of nuclear factor- κ B activation. *Clinical & Experimental Allergy*, 36(6), 785-794.

Jin, W., Zhang, Q., Wang, J., & Zhang, W. (2013). A comparative study of the anticoagulant activities of eleven fucoidans. *Carbohydrate polymers*, 91(1), 1-6.

Kwon, P. S., Oh, H., Kwon, S. J., Jin, W., Zhang, F., Fraser, K., ... & Dordick, J. S. (2020). Sulfated polysaccharides effectively inhibit SARS-CoV-2 in vitro. *Cell discovery*, 6(1), 50.

Kikionis, S., Ioannou, E., Aggelidou, E., Tziveleka, L. A., Demiri, E., Bakopoulou, A., ... & Roussis, V. (2021). The marine polysaccharide ulvan confers potent osteoinductive capacity to PCL-based scaffolds for bone tissue engineering applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3086.

Kumar, D., Pugazhendi, A., Bajhaiya, A. K., & Gugulothu, P. (2021). Biofuel production from Macroalgae: present scenario and future scope. *Bioengineered*, 12(2), 9216.

Kwon, P. S., Oh, H., Kwon, S. J., Jin, W., Zhang, F., Fraser, K., ... & Dordick, J. S. (2020). Sulfated polysaccharides effectively inhibit SARS-CoV-2 in vitro. *Cell discovery*, 6(1), 50.

Kloareg, B., Badis, Y., Cock, J. M., & Michel, G. (2021). Role and evolution of the extracellular matrix in the acquisition of complex multicellularity in eukaryotes: a macroalgal perspective. *Genes*, 12(7), 1059.

Kornprobst, J. M. (2005). Substances naturelles d'origine marine: chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies (Vol. 1). Paris, France: Editions Tec & Doc.

Kupper, F. C., Müller, D. G., Peters, A. F., Kloareg, B., & Potin, P. (2002). Oligoalginate recognition and oxidative burst play a key role in natural and induced resistance of sporophytes of Laminariales. *Journal of chemical ecology*, 28, 2057-2081.

Khajouei, R. A., Keramat, J., Hamdami, N., Ursu, A. V., Delattre, C., Laroche, C., ... & Michaud, P. (2018). Extraction and characterization of an alginate from the Iranian brown seaweed *Nizimuddinia zanardini*. *International journal of biological macromolecules*, 118, 1073-1081.

Kim, J. S., Hyun, T. K., & Kim, M. J. (2011). The inhibitory effects of ethanol extracts from sorghum, foxtail millet and proso millet on α -glucosidase and α -amylase activities. *Food Chemistry*, 124(4), 1647-1651.

Kandikattu, K., Kumar, P. B. R., Priya, R. V., Kumar, K. S., & Rathore, R. S. B. (2013). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium parviflorum* by in-vitro method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 1(5), 729-731.

Kristiansen, C. M., & Zanna, M. P. (1994). The rhetorical use of values to justify social and intergroup attitudes. *Journal of Social Issues*, 50(4), 47-65.

Karray, R., Karray, F., Loukil, S., Mhiri, N., & Sayadi, S. (2017). Anaerobic co-digestion of Tunisian green macroalgae *Ulva rigida* with sugar industry wastewater for biogas and methane production enhancement. *Waste Management*, 61, 171-178.

Kaushik, S., Masand, N., Iyer, M. R., & Patil, V. M. (2023). Preclinical to Clinical Profile of *Curcuma longa* as Antidiabetic Therapeutics. *Current Topics in Medicinal Chemistry*.

Khambhaty, Y., Upadhyay, D., Kriplani, Y., Joshi, N., Mody, K., & Gandhi, M. R. (2013). Bioethanol from macroalgal biomass: utilization of marine yeast for production of the same. *BioEnergy Research*, 6, 188-195.

Kulshreshtha, G., Hincke, M. T., Prithiviraj, B., & Critchley, A. (2020). A review of the varied uses of macroalgae as dietary supplements in selected poultry with special reference to laying hen and broiler chickens. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(7), 536.

Kotta, J., Raudsepp, U., Szava-Kovats, R., Aps, R., Armoskaite, A., Barda, I., ... & Barboza, F. R. (2022). Assessing the potential for sea-based macroalgae cultivation and its application for nutrient removal in the Baltic Sea. *Science of the Total Environment*, 839, 156230.

Kmiha-Megdiche, S., Drira, Z., & Ayadi, H. (2020). Response of Zooplankton Population to Environmental Forcing: Case of Southern and Northern Coasts of Sfax, Tunisia. *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources*, 23(2), 55-71.

Ktari, L., Chebil Ajjabi, L., De Clerck, O., Gómez Pinchetti, J. L., & Rebours, C. (2021). Seaweeds as a promising resource for blue economy development in Tunisia: current state, opportunities, and challenges. *Journal of Applied Phycology*, 1-17.

Kazmi, S. S. U. H., Yapa, N., Karunarathna, S. C., & Suwannarach, N. (2022). Perceived Intensification in Harmful Algal Blooms Is a Wave of Cumulative Threat to the Aquatic Ecosystems. *Biology* 2022, 11, 852.

Kloareg, B., Badis, Y., Cock, J. M., & Michel, G. (2021). Role and evolution of the extracellular matrix in the acquisition of complex multicellularity in eukaryotes: a macroalgal perspective. *Genes*, 12(7), 1059.

Katsaros, C., & Galatis, B. (1986). Ultrastructural studies on zoosporogenesis of *Halopteris filicina* (Sphacelariales, Phaeophyta). *Phycologia*, 25(3), 358-370.

Kondracki Bourguet, M. L., & Kornprobst, J. M. (2005). Marine pharmacology: potentialities in the treatment of infectious diseases, osteoporosis and Alzheimer's disease. *Marine Biotechnology* II, 105-131.

Kawee-ai, A., Kuntiya, A., & Kim, S. M. (2013). Anticholinesterase and antioxidant activities of fucoxanthin purified from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Natural Product Communications*, 8(10), 1934578X1300801010.

Kumar, L., & Bharadvaja, N. (2020). A review on microalgae biofuel and biorefinery: challenges and way forward. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 1-24.

Kumar, B. R., Mathimani, T., Sudhakar, M. P., Rajendran, K., Nizami, A. S., Brindhadevi, K., & Pugazhendhi, A. (2021). A state of the art review on the cultivation of algae for energy and other valuable products: application, challenges, and opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 138, 110649.

Khalid, A., Aslam, M., Qyyum, M. A., Faisal, A., Khan, A. L., Ahmed, F., ... & Yasin, M. (2019). Membrane separation processes for dehydration of bioethanol from fermentation broths: Recent developments, challenges, and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 105, 427-443.

Kumar, M. D., Kavitha, S., Tyagi, V. K., Rajkumar, M., Bhatia, S. K., Kumar, G., & Banu, J. R. (2021). Macroalgae-derived biohydrogen production: biorefinery and circular bioeconomy. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-23.

Kroschinsky, F., Stölzel, F., von Bonin, S., Beutel, G., Kochanek, M., Kiehl, M., ... & Intensive Care in Hematological and Oncological Patients (iCHOP) Collaborative Group. (2017). New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. *Critical Care*, 21, 1-11.

Konda, N. M., Singh, S., Simmons, B. A., & Klein-Marcuschamer, D. (2015). An investigation on the economic feasibility of macroalgae as a potential feedstock for biorefineries. *BioEnergy Research*, 8, 1046-1056.

Karaki, N., Sebaaly, C., Chahine, N., Faour, T., Zinchenko, A., Rachid, S., & Kanaan, H. (2013). The antioxidant and anticoagulant activities of polysaccharides isolated from the brown algae *Dictyopteris polypodioides* growing on the Lebanese coast. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(2), 043-051.

Kim, K. T., Rioux, L. E., & Turgeon, S. L. (2014). Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*, 98, 27-33.

Koh, H. S. A., Lu, J., & Zhou, W. (2020). Structural dependence of sulfated polysaccharide for diabetes management: fucoidan from *Undaria pinnatifida* inhibiting α -glucosidase more strongly than α -amylase and amyloglucosidase. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 831.

Kuda, T., Tsunekawa, M., Hishi, T., & Araki, Y. (2005). Antioxidant properties of driedkayamori', a brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). *Food Chemistry*, 89(4), 617-622.

Khajouei, R. A., Keramat, J., Hamdami, N., Ursu, A. V., Delattre, C., Gardarin, C., ... & Michaud, P. (2021). Effect of high voltage electrode discharge on the physicochemical characteristics of alginate extracted from an Iranian brown seaweed (*Nizimuddinia zanardini*). *Algal Research*, 56, 102326.

Kavitha, N., Karunya, T. P., Kanchana, S., Mohan, K., Sivaramakrishnan, R., Uthra, S., ... & Arumugam, M. (2019). Formulation of alginate based hydrogel from brown seaweed, *Turbinaria conoides* for biomedical applications. *Heliyon*, 5(12), e02916.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.

Kraay, G. W., Zapata, M., & Veldhuis, M. J. (1992). SEPARATION OF CHLOROPHYLLS c1c2, AND c3 OF MARINE PHYTOPLANKTON BY REVERSED-PHASE-C18-HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY 1. *Journal of Phycology*, 28(5), 708-712.

Kawee-Ai, A., Kim, A. T., & Kim, S. M. (2019). Inhibitory activities of microalgal fucoxanthin against α -amylase, α -glucosidase, and glucose oxidase in 3T3-L1 cells linked to type 2 diabetes. *Journal of Oceanology and Limnology*, 37, 928-937.

Kumar, Y., Singhal, S., Tarafdar, A., Pharande, A., Ganesan, M., & Badgujar, P. C. (2020). Ultrasound assisted extraction of selected edible macroalgae: Effect on antioxidant activity and quantitative assessment of polyphenols by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Algal Research*, 52, 102114.

Kunitz, M. (1947). Isolation of a crystalline protein compound of trypsin and of soybean trypsin-inhibitor. *The Journal of general physiology*, 30(4), 311.

Krylova, N. V., Ermakova, S. P., Lavrov, V. F., Leneva, I. A., Kompanets, G. G., Iunikhina, O. V., ... & Zaporozhets, T. S. (2020). The comparative analysis of antiviral activity of native and modified fucoidans from brown alga *Fucus evanescens* in vitro and in vivo. *Marine drugs*, 18(4), 224.

Kim, H. M., Wi, S. G., Jung, S., Song, Y., & Bae, H. J. (2015). Efficient approach for bioethanol production from red seaweed *Gelidium amansii*. *Bioresource technology*, *175*, 128-134.

Kawada, A., Hiura, N., Shiraiwa, M., Tajima, S., Hiruma, M., Hara, K., ... & Takahara, H. (1997). Stimulation of human keratinocyte growth by alginate oligosaccharides, a possible co-factor for epidermal growth factor in cell culture. *FEBS letters*, *408*(1), 43-46.

Khajouei, R. A., Keramat, J., Hamdami, N., Ursu, A. V., Delattre, C., Laroche, C., ... & Michaud, P. (2018). Extraction and characterization of an alginate from the Iranian brown seaweed *Nizimuddinina zanardini*. *International journal of biological macromolecules*, *118*, 1073-1081.

Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S. M., Moore, M. C., Renner, S., Woods, S. C., ... & Tschöp, M. H. (2018). Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, *14*(3), 140-162.

Klettner, A. (2016). Fucoïdan as a potential therapeutic for major blinding diseases—A hypothesis. *Marine drugs*, *14*(2), 31.

Kontominas, M. G. (2020). Use of alginates as food packaging materials. *Foods*, *9*(10), 1440.

Kraan, S. (2012). Algal polysaccharides, novel applications and outlook. In *Carbohydrates-comprehensive studies on glycobiology and glycotecnology*. IntechOpen.

Kupper, F. C., Kloareg, B., Guern, J., & Potin, P. (2001). Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant physiology*, *125*(1), 278-291.

Kurachi, M., Nakashima, T., Miyajima, C., Iwamoto, Y., Muramatsu, T., Yamaguchi, K., & Oda, T. (2005). Comparison of the activities of various alginates to induce TNF- α secretion in RAW264. 7 cells. *Journal of infection and chemotherapy*, *11*, 199-203.

Losada-Lopez, C., Dopico, D. C., & Faina-Medin, J. A. (2021). Neophobia and seaweed consumption: Effects on consumer attitude and willingness to consume seaweed. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *24*, 100338.

Leandro, A., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. (2019). Diverse applications of marine macroalgae. *Marine drugs*, *18*(1), 17.

Lähteenmäki-Uutela, A., Rahikainen, M., Camarena-Gómez, M. T., Piiparinen, J., Spilling, K., & Yang, B. (2021). European Union legislation on macroalgae products. *Aquaculture International*, *29*, 487-509.

López-Hortas, L., Flórez-Fernández, N., Torres, M. D., Ferreira-Anta, T., Casas, M. P., Balboa, E. M., ... & Domínguez, H. (2021). Applying seaweed compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics. *Marine drugs*, *19*(10), 552.

Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Pereira, A. G., García-Oliveira, P., ... & Simal-Gandara, J. (2021). Biological action mechanisms of fucoxanthin extracted from algae for application in food and cosmetic industries. *Trends in Food Science & Technology*, *117*, 163-181.

Liu, J., Yang, S., Li, X., Yan, Q., Reaney, M. J., & Jiang, Z. (2019). Alginate oligosaccharides: Production, biological activities, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(6), 1859-1881.

Lobban, C. S., & Wynne, M. J. (Eds.). (1981). *The biology of seaweeds* (Vol. 17). Univ of California Press.

Lipinska, A. P., Ahmed, S., Peters, A. F., Faugeron, S., Cock, J. M., & Coelho, S. M. (2015). Development of PCR-based markers to determine the sex of kelps. *PLoS One*, 10(10), e0140535.

Lee, W. K., & Ho, C. L. (2022). Ecological and evolutionary diversification of sulphated polysaccharides in diverse photosynthetic lineages: A review. *Carbohydrate Polymers*, 277, 118764.

Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Pereira, A. G., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., ... & Simal-Gandara, J. (2020). Metabolites from macroalgae and its applications in the cosmetic industry: A circular economy approach. *Resources*, 9(9), 101.

Lopes, D., Rey, F., Leal, M. C., Lillebø, A. I., Calado, R., & Domingues, M. R. (2021). Bioactivities of lipid extracts and complex lipids from seaweeds: Current knowledge and future prospects. *Marine Drugs*, 19(12), 686.

Lomartire, S., Cotas, J., Pacheco, D., Marques, J. C., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. (2021). Environmental impact on seaweed phenolic production and activity: An important step for compound exploitation. *Marine Drugs*, 19(5), 245.

Llewellyn, C. A., & Airs, R. L. (2010). Distribution and abundance of MAAs in 33 species of microalgae across 13 classes. *Marine drugs*, 8(4), 1273-1291.

Lin, Y., Qi, X., Liu, H., Xue, K., Xu, S., & Tian, Z. (2020). The anti-cancer effects of fucoidan: A review of both in vivo and in vitro investigations. *Cancer cell international*, 20(1), 154.

Liu, Z., & Sun, X. (2020). A critical review of the abilities, determinants, and possible molecular mechanisms of seaweed polysaccharides antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7774.

Lahaye, M., & Robic, A. (2007). Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8(6), 1765-1774.

Li, Y., Zheng, Y., Zhang, Y., Yang, Y., Wang, P., Imre, B., ... & Wang, D. (2021). Brown algae carbohydrates: Structures, pharmaceutical properties, and research challenges. *Marine Drugs*, 19(11), 620.

Luthuli, S., Wu, S., Cheng, Y., Zheng, X., Wu, M., & Tong, H. (2019). Therapeutic effects of fucoidan: A review on recent studies. *Marine drugs*, 17(9), 487.

Lim, S., Sharifah, H., Wan, A., & Lim, S. (2017). Effects of different precipitation method on physicochemical properties and antioxidant activities of alginates from *Sargassum* sp. *Sains Malaysiana*, 46(10), 1807-1816.

Li, X., Zhang, G., Li, J., Jiang, T., Chen, H., Li, P., & Guan, Y. (2021). Degradation by Vc-H₂O₂, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Passiflora edulis* peel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(12), e16074.

Lim, S. J., Aida, W. M. W., Maskat, M. Y., Mamot, S., Ropien, J., & Mohd, D. M. (2014). Isolation and antioxidant capacity of fucoïdan from selected Malaysian seaweeds. *Food Hydrocolloids*, 42, 280-288.

Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Launay, B., & Parker, A. (2000). Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures. *Food hydrocolloids*, 14(4), 273-280.

López-Moral, A., Agustí-Brisach, C., & Trapero, A. (2021). Plant biostimulants: New insights into the biological control of *Verticillium* wilt of olive. *Frontiers in Plant Science*, 12, 662178.

Leong, Y. K., Chen, C. Y., Varjani, S., & Chang, J. S. (2022). Producing fucoxanthin from algae—Recent advances in cultivation strategies and downstream processing. *Bioresource technology*, 344, 126170.

Liaaen-Jensen, S., & Jensen, A. (1971). [56] Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. In *Methods in enzymology* (Vol. 23, pp. 586-602). Academic Press.

Liu, H., & Wang, G. (2014). Fermentative hydrogen production from macro-algae *Laminaria japonica* using anaerobic mixed bacteria. *International journal of hydrogen energy*, 39(17), 9012-9017.

Langlois, M., Allard, J. P., Nugier, F., & Aymard, M. (1986). A rapid and automated colorimetric assay for evaluating the sensitivity of herpes simplex strains to antiviral drugs. *Journal of biological standardization*, 14(3), 201-211.

Liu, M., Li, W., Chen, Y., Wan, X., & Wang, J. (2020). Fucoxanthin: A promising compound for human inflammation-related diseases. *Life sciences*, 255, 117850.

Levasseur, W., Perré, P., & Pozzobon, V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology advances*, 41, 107545.

Lee, M. Y., Choi, D. S., Lee, M. K., Lee, H. W., Park, T. S., Kim, D. M., ... & Shin, H. K. (2014). Comparison of acarbose and voglibose in diabetes patients who are inadequately

controlled with basal insulin treatment: randomized, parallel, open-label, active-controlled study. *Journal of Korean medical science*, 29(1), 90-97.

Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., ... & Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21(10), 1374.

Li, W., Zheng, P., Guo, J., Ji, J., Zhang, M., Zhang, Z., ... & Abbas, G. (2014). Characteristics of self-alkalization in high-rate denitrifying automatic circulation (DAC) reactor fed with methanol and sodium acetate. *Bioresource technology*, 154, 44-50.

Levine, R. B., Pinnarat, T., & Savage, P. E. (2010). Biodiesel production from wet algal biomass through in situ lipid hydrolysis and supercritical transesterification. *Energy & Fuels*, 24(9), 5235-5243.

Li, X., Bai, Y., Jin, Z., & Svensson, B. (2022). Food-derived non-phenolic α -amylase and α -glucosidase inhibitors for controlling starch digestion rate and guiding diabetes-friendly recipes. *Lwt*, 153, 112455.

Lapasin, R., & Prici, S. (1999). Rheology of Industrial Polysaccharides-Theory and Applications. Gaithersburg, Maryland.

Lee, H. M., Kim, J. K., & Cho, T. S. (2012). Applications of ophthalmic biomaterials embedded with fucoidan. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18(4), 1197-1201.

Lee, J. B., Hayashi, K., Hayashi, T., Sankawa, U., & Maeda, M. (1999). Antiviral activities against HSV-1, HCMV, and HIV-1 of rhamnan sulfate from *Monostroma latissimum*. *Planta Medica*, 65(05), 439-441.

Leiman, D. A., Riff, B. P., Morgan, S., Metz, D. C., Falk, G. W., French, B., ... & Lewis, J. D. (2017). Alginate therapy is effective treatment for GERD symptoms: a systematic review and meta-analysis. *Diseases of the Esophagus*, 30(5), 1.

Li, J., Wang, X., Lin, X., Yan, G., Liu, L., Zheng, H., ... & Guo, Y. D. (2018). Alginate-derived oligosaccharides promote water stress tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 130, 80-88.

Li, Y., Zheng, Y., Zhang, Y., Yang, Y., Wang, P., Imre, B., ... & Wang, D. (2021). Brown algae carbohydrates: Structures, pharmaceutical properties, and research challenges. *Marine Drugs*, 19(11), 620.

Lin, J., Jiao, G., & Kermanshahi-Pour, A. (2022). Algal Polysaccharides-Based Hydrogels: Extraction, Synthesis, Characterization, and Applications. *Marine Drugs*, 20(5), 306.

Liu, H., Zhang, Y. H., Yin, H., Wang, W. X., Zhao, X. M., & Du, Y. G. (2013). Alginate oligosaccharides enhanced *Triticum aestivum* L. tolerance to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 62, 33-40.

Liu, J., Wu, S., Cheng, Y., Liu, Q., Su, L., Yang, Y., ... & Tong, H. (2021). Sargassum fusiforme alginate relieves hyperglycemia and modulates intestinal microbiota and metabolites in type 2 diabetic mice. *Nutrients*, *13*(8), 2887.

Liu, R., Jiang, X., Guan, H., Li, X., Du, Y., Wang, P., & Mou, H. (2009). Promotive effects of alginate-derived oligosaccharides on the inducing drought resistance of tomato. *Journal of Ocean University of China*, *8*, 303-311.

Lomartire, S., & Gonçalves, A. M. (2022). Antiviral activity and mechanisms of seaweeds bioactive compounds on enveloped viruses—A review. *Marine Drugs*, *20*(6), 385.

López-Rodríguez, R., Domínguez, L., Fernández-Ruiz, V., & Cámara, M. (2022). Extracts Rich in Nutrients as Novel Food Ingredients to Be Used in Food Supplements: A Proposal Classification. *Nutrients*, *14*(15), 3194.

Luan, L. Q., Ha, V. T. T., Uyen, N. H. P., Trang, L. T. T., & Hien, N. Q. (2012). Preparation of oligoalginate plant growth promoter by γ irradiation of alginate solution containing hydrogen peroxide. *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*(7), 1737-1741.

Luescher-Mattli, M. (2003). Algae, a possible source for new drugs in the treatment of HIV and other viral diseases. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents*, *2*(3), 219-225.

Luo, D., Zhang, Q., Wang, H., Cui, Y., Sun, Z., Yang, J., ... & Wang, X. (2009). Fucoidan protects against dopaminergic neuron death in vivo and in vitro. *European Journal of Pharmacology*, *617*(1-3), 33-40.

Mollah, M. Z. I., Zahid, H. M., Mahal, Z., Faruque, M. R. I., & Khandaker, M. U. (2021). The Usages and Potential Uses of Alginate for Healthcare Applications. *Frontiers in molecular biosciences*, *8*, 719972.

Morganti, P., Morganti, G., Gagliardini, A., & Lohani, A. (2021). From Cosmetics to Innovative Cosmeceuticals—Non-Woven Tissues as New Biodegradable Carriers. *Cosmetics* *2021*, *8*, 65.

Milhazes-Cunha, H., & Otero, A. (2017). Valorisation of aquaculture effluents with microalgae: the integrated multi-trophic aquaculture concept. *Algal Research*, *24*, 416-424.

Mahmood, T., Hussain, N., Shahbaz, A., Mulla, S. I., Iqbal, H. M., & Bilal, M. (2022). Sustainable production of biofuels from the algae-derived biomass. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1-21.

Mangialajo, L., Chiantore, M., & Cattaneo-Vietti, R. (2008). Loss of fucoid algae along a gradient of urbanisation, and structure of benthic assemblages. *Marine Ecology Progress Series*, *358*, 63-74.

Morais, T., Cotas, J., Pacheco, D., & Pereira, L. (2021). Seaweeds compounds: an ecosustainable source of cosmetic ingredients?. *Cosmetics*, *8*(1), 8.

Mourelle, M. L., Gómez, C. P., & Legido, J. L. (2017). The potential use of marine microalgae and cyanobacteria in cosmetics and thalassotherapy. *Cosmetics*, *4*(4), 46.

Madera-Santana, T. J., Robledo, D., & Freile-Pelegrín, Y. (2011). Physicochemical properties of biodegradable polyvinyl alcohol–agar films from the red algae *Hydropuntia cornea*. *Marine biotechnology*, 13, 793-800.

McHugh, D. J. (1987). Production, properties and uses of alginates. Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. FAO. Fish. Tech. Pap, 288, 58-115.

Muradian, K., Vaiserman, A., Min, K. J., & Fraifeld, V. E. (2015). Fucoxanthin and lipid metabolism: A minireview. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 25(10), 891-897.

Milledge, J. J., Smith, B., Dyer, P. W., & Harvey, P. (2014). Macroalgae-derived biofuel: a review of methods of energy extraction from seaweed biomass. *Energies*, 7(11), 7194-7222.

Meñez, E. G., & Mathieson, A. C. (1981). The marine algae of Tunisia.

Maiz, N. B., Boudouresque, C. F., & Ouahchi, F. (1987). Inventaire des algues et phanérogames marines benthiques de la Tunisie. *Plant Biosystem*, 121(5-6), 259-304.

Morand-Fehr, P., Bas, P., Blanchart, G., Daccord, R., Giger-Reverdin, S., Gihad, E. A., ... & Sauvart, D. (1991). Influence of feeding on goat milk composition and technological characteristics. *Goat nutrition*, 46, 209-224.

Mutripah, S., Meinita, M. D. N., Kang, J. Y., Jeong, G. T., Susanto, A. B., Prabowo, R. E., & Hong, Y. K. (2014). Bioethanol production from the hydrolysate of *Palmaria palmata* using sulfuric acid and fermentation with brewer's yeast. *Journal of applied phycology*, 26, 687-693.

Muthukumar, J., Chidambaram, R., & Sukumaran, S. (2021). Sulfated polysaccharides and its commercial applications in food industries—A review. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 2453-2466.

Mesnildrey, L., Jacob, C., Frangoudes, K., Reunavot, M., & Lesueur, M. (2012). La filière des macro-algues en France. Rapport d'étude. NETALGAE-Interreg IVb.

Morales-Contreras, B. E., Flórez-Fernández, N., Torres, M. D., Domínguez, H., Rodríguez-Jasso, R. M., & Ruiz, H. A. (2022). Hydrothermal systems to obtain high value-added compounds from macroalgae for bioeconomy and biorefineries. *Bioresource Technology*, 343, 126017.

Medeiros, V. P., Queiroz, K. C. S., Cardoso, M. L., Monteiro, G. R. G., Oliveira, F. W., Chavante, S. F., ... & Leite, E. L. (2008). Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: anticoagulant and anti-inflammatory properties. *Biochemistry (Moscow)*, 73, 1018-1024.

McNaught, A. D. (1996). Nomenclature of carbohydrates (IUPAC Recommendations 1996). *Pure and Applied Chemistry*, 68(10), 1919-2008.

Meinita, M. D. N., Harwanto, D., & Choi, J. S. (2022). A concise review of the bioactivity and pharmacological properties of the genus *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 34(6), 2827-2845.

Makkar, F., & Chakraborty, K. (2017). Antidiabetic and anti-inflammatory potential of sulphated polygalactans from red seaweeds *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria opuntia*. *International Journal of Food Properties*, 20(6), 1326-1337.

Matsubara, K., Matsuura, Y., Bacic, A., Liao, M. L., Hori, K., & Miyazawa, K. (2001). Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28(5), 395-399.

Méresse, S., Fodil, M., Fleury, F., & Chénais, B. (2020). Fucoxanthin, a marine-derived carotenoid from brown seaweeds and microalgae: A promising bioactive compound for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9273.

Min, S. K., Kwon, O. C., Lee, S., Park, K. H., & Kim, J. K. (2012). An antithrombotic fucoidan, unlike heparin, does not prolong bleeding time in a murine arterial thrombosis model: a comparative study of *Undaria pinnatifida* sporophylls and *Fucus vesiculosus*. *Phytotherapy research*, 26(5), 752-757.

Miyashita, K., Mikami, N., & Hosokawa, M. (2013). Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1507-1517.

Mayala, T. S., Ngavouka, M. D. N., Douma, D. H., Hammerton, J. M., Ross, A. B., Brown, A. E., ... & Lovett, J. C. (2022). Characterisation of Congolese Aquatic Biomass and Their Potential as a Source of Bioenergy. *Biomass*, 2(1), 1-13.

Montingelli, M. E., Tedesco, S., & Olabi, A. G. (2015). Biogas production from algal biomass: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 43, 961-972.

Maneein, S., Milledge, J. J., Nielsen, B. V., & Harvey, P. J. (2018). A review of seaweed pre-treatment methods for enhanced biofuel production by anaerobic digestion or fermentation. *Fermentation*, 4(4), 100.

Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O., & Jensen, I. J. (2018). Protein determination—method matters. *Foods*, 7(1), 5.

Monsigny, M., Petit, C., & Roche, A. C. (1988). Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Analytical biochemistry*, 175(2), 525-530.

Montreuil, J., Spik, G., Chosson, A., Segard, E., & Scheppler, N. (1963). Methods of study of the structure of glycoproteins. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 18, 529-546.

McLaren, C., Ellis, M. N., & Hunter, G. (1983). A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of herpes simplex viruses to antiviral agents. *Antiviral research*, 3(4), 223-234.

Minghou, J., Yujun, W., Zuhong, X., & Yucai, G. (1984). Studies on the M: G ratios in alginate. In *Eleventh International Seaweed Symposium: Proceedings of the Eleventh International Seaweed Symposium, held in Qingdao, People's Republic of China, June 19–25, 1983* (pp. 554-556). Springer Netherlands.

Mian, A. J., & Percival, E. (1973). Carbohydrates of the brown seaweeds *himanthalia lorea* and *bifurcaria bifurcata*: Part II. structural studies of the “fucans”. *Carbohydrate Research*, 26(1), 147-161.

Mzibra, A., Aasfar, A., Douira, A., KADMIRI, I. M., & BAMOUH, A. (2022). Utilisation des polysaccharides des algues marines comme biostimulants en horticulture. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 10(2), 229-233.

Mumu, M., Das, A., Emran, T. B., Mitra, S., Islam, F., Roy, A., ... & Kim, B. (2022). Fucoxanthin: A promising phytochemical on diverse pharmacological targets. *Frontiers in Pharmacology*, 13.

Maurya, V. K., Shakya, A., Aggarwal, M., Gothandam, K. M., Bohn, T., & Pareek, S. (2021). Fate of β -carotene within loaded delivery systems in food: state of knowledge. *Antioxidants*, 10(3), 426.

Motshakeri, M., Ebrahimi, M., Goh, Y. M., Matanjun, P., & Mohamed, S. (2013). *Sargassum polycystum* reduces hyperglycaemia, dyslipidaemia and oxidative stress via increasing insulin sensitivity in a rat model of type 2 diabetes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1772-1778.

Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Murakami-Funayama, K., & Miyashita, K. (2009). Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Molecular Medicine Reports*, 2(6), 897-902.

Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1261-1274.

Marshall, J. J., & Lauda, C. M. (1975). Assay of α -Amylase Inhibitor Activity in Legumes. *Starch-Stärke*, 27(8), 274-278.

Morita, A., Ouchi, M., Satoh, K., Kobayashi, S., Terada, M., Wakashin, H., ... & Fujita, T. (2021). The Effects of Trypsin Inhibitor on Insulin Secretion Using Rat Pancreas in an Organ Bath. *in vivo*, 35(5), 2551-2558.

Maeda, H., Kanno, S., Kodate, M., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2015). Fucoxanthinol, metabolite of fucoxanthin, improves obesity-induced inflammation in adipocyte cells. *Marine drugs*, 13(8), 4799-4813.

Matsumoto, M., Waki, N., Suganuma, H., Takahashi, I., Kurauchi, S., Sawada, K., ... & Nakaji, S. (2020). Association between biomarkers of cardiovascular diseases and the blood concentration of carotenoids among the general population without apparent illness. *Nutrients*, 12(8), 2310.

Milledge, J. J., Smith, B., Dyer, P. W., & Harvey, P. (2014). Macroalgae-derived biofuel: a review of methods of energy extraction from seaweed biomass. *Energies*, 7(11), 7194-7222.

Mechery, J., Thomas, D. M., Kumar, C. P., Joseph, L., & Syllas, V. P. (2021). Biohydrogen production from acidic and alkaline hydrolysates of paddy straw using locally

isolated facultative bacteria through dark fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *11*, 1263-1272.

Magwaza, S. T. N., & Islam, M. S. (2023). Roles of Marine Macroalgae or Seaweeds and Their Bioactive Compounds in Combating Overweight, Obesity and Diabetes: A Comprehensive Review. *Marine Drugs*, *21*(4), 258.

Meinita, M. D. N., Kang, J. Y., Jeong, G. T., Koo, H. M., Park, S. M., & Hong, Y. K. (2012). Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). *Journal of Applied Phycology*, *24*, 857-862.

Mohan, M. S. G., Achary, A., Mani, V., Cicinskas, E., Kalitnik, A. A., & Khotimchenko, M. (2019). Purification and characterization of fucose-containing sulphated polysaccharides from *Sargassum tenerrimum* and their biological activity. *Journal of Applied Phycology*, *31*, 3101-3113.

Manlusoc, J. K. T., Hsieh, C. L., Hsieh, C. Y., Salac, E. S. N., Lee, Y. T., & Tsai, P. W. (2019). Pharmacologic application potentials of sulfated polysaccharide from marine algae. *Polymers*, *11*(7), 1163.

Maskat, Y., SENG, N. S. S., MOHD, N. S., & WAN, W. A. (2022). Monosaccharide Profile and Antioxidant Activities of Sulphated Polysaccharide Extracted from Indonesian Brown Seaweed (*Sargassum* sp.). *Sains Malaysiana*, *51*(10), 3195-3202.

Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K., & Miyashita, K. (2005). Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochemical and biophysical research communications*, *332*(2), 392-397.

Mazumder, S., Ghosal, P. K., Pujol, C. A., Carlucci, M. J., Damonte, E. B., & Ray, B. (2002). Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *International journal of biological macromolecules*, *31*(1-3), 87-95.

Ming, L. I. U., Lei, L. I. U., Zhang, H. F., Bao, Y. I., & Everaert, N. (2021). Alginate oligosaccharides preparation, biological activities and their application in livestock and poultry. *Journal of Integrative Agriculture*, *20*(1), 24-34.

Mintel. Seaweed-flavoured food and drink launches increased by 147% in Europe between 2011 and 2015. Available online: <http://www.mintel.com/press-centre/food-and-drink/seaweed-flavoured-food-and-drink-launches-increased-by-147-in-europe-between-2011-and-2015> (accessed on 9 March 2016).

Mollah, M. Z. I., Khan, M. A., & Khan, R. A. (2009). Effect of gamma irradiated sodium alginate on red amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) as growth promoter. *Radiation Physics and Chemistry*, *78*(1), 61-64.

Mohan, E. H., Madhusudan, S., & Baskaran, R. (2023). The sea lettuce *Ulva sensu lato*: Future food with health-promoting bioactives. *Algal Research*, 103069.

Mosquera, M. E., Jiménez, G., Taberero, V., Vinueza-Vaca, J., García-Estrada, C., Kosalková, K., ... & Valera, M. Á. (2021). Terpenes and Terpenoids: Building Blocks to Produce Biopolymers. *Sustainable Chemistry*, 2(3), 467-492.

Naik, A., Cardozo, J., Fernandes, R., Khan, A., & Bhandari, R. (2020). Photosynthetic pigments, lipids and phenolic compounds of three green algae isolated from freshwater ecosystem.

Nishino, T., Nagumo, T., Kiyohara, H., & Yamada, H. (1991). Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Carbohydrate Research*, 211(1), 77-90.

Nagarajan, S., Jones, R. J., Oram, L., Massanet-Nicolau, J., & Guwy, A. (2022). Intensification of Acidogenic Fermentation for the Production of Biohydrogen and Volatile Fatty Acids—A Perspective. *Fermentation*, 8(7), 325.

Naik, A., Cardozo, J., Fernandes, R., Khan, A., & Bhandari, R. (2020). Photosynthetic pigments, lipids and phenolic compounds of three green algae isolated from freshwater ecosystem.

Nagarajan, S., Jones, R. J., Oram, L., Massanet-Nicolau, J., & Guwy, A. (2022). Intensification of Acidogenic Fermentation for the Production of Biohydrogen and Volatile Fatty Acids—A Perspective. *Fermentation*, 8(7), 325.

Na, Y. S., Kim, W. J., Kim, S. M., Park, J. K., Lee, S. M., Kim, S. O., ... & Park, Y. I. (2010). Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. *International immunopharmacology*, 10(3), 364-370.

Nwosu, F., Morris, J., Lund, V. A., Stewart, D., Ross, H. A., & McDougall, G. J. (2011). Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food chemistry*, 126(3), 1006-1012.

Noblecourt, A., Christophe, G., Larroche, C., & Fontanille, P. (2018). Hydrogen production by dark fermentation from pre-fermented depackaging food wastes. *Bioresource Technology*, 247, 864-870.

Noblecourt, A., Christophe, G., Larroche, C., Santa-Catalina, G., Trably, E., & Fontanille, P. (2017). High hydrogen production rate in a submerged membrane anaerobic bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(39), 24656-24666.

Nephali, L., Piater, L. A., Dubery, I. A., Patterson, V., Huyser, J., Burgess, K., & Tugizimana, F. (2020). Biostimulants for plant growth and mitigation of abiotic stresses: A metabolomics perspective. *Metabolites*, 10(12), 505.

Obluchinskaya, E. D., Pozharitskaya, O. N., & Shikov, A. N. (2022). In Vitro anti-inflammatory activities of fucoidans from five species of brown seaweeds. *Marine Drugs*, 20(10), 606.

Oliyaie, N., Moosavi-Nasab, M., & Mazloomi, S. M. (2022). Therapeutic activity of fucoidan and carrageenan as marine algal polysaccharides against viruses. *3 Biotech*, *12*(7), 154.

Ognyanov, M., Remoroza, C., Schols, H. A., Georgiev, Y., Kratchanova, M., & Kratchanov, C. (2016). Isolation and structure elucidation of pectic polysaccharide from rose hip fruits (*Rosa canina* L.). *Carbohydrate Polymers*, *151*, 803-811.

Ortiz, J., Uquiche, E., Robert, P., Romero, N., Quitral, V., & Llantén, C. (2009). Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*. *European journal of lipid science and technology*, *111*(4), 320-327.

Obata, O., Akunna, J., Bockhorn, H., & Walker, G. (2016). Ethanol production from brown seaweed using non-conventional yeasts. *Bioethanol*, *2*(1), 134-145.

Ozgun, S., & Turan, F. (2015). Biochemical composition of some brown algae from Iskenderun Bay, the northeastern Mediterranean coast of Turkey. *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, *21*(2), 125-134.

Offei, F., Mensah, M., Thygesen, A., & Kemausuor, F. (2018). Seaweed bioethanol production: A process selection review on hydrolysis and fermentation. *Fermentation*, *4*(4), 99.

Olofsson, K., Bertilsson, M., & Lidén, G. (2008). A short review on SSF—an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for biofuels*, *1*(1), 1-14.

Osman, N. I., Sidik, N. J., Awal, A., Adam, N. A. M., & Rezali, N. I. (2016). In vitro xanthine oxidase and albumin denaturation inhibition assay of *Barringtonia racemosa* L. and total phenolic content analysis for potential anti-inflammatory use in gouty arthritis. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, *5*(4), 343.

Oliveira, R. M., Câmara, R. B. G., Monte, J. F. S., Viana, R. L. S., Melo, K. R. T., Queiroz, M. F., ... & Rocha, H. A. O. (2018). Commercial fucoidans from *Fucus vesiculosus* can be grouped into antiadipogenic and adipogenic agents. *Marine Drugs*, *16*(6), 193.

Orkesterjournalen, L. (2018). Commission Implementing Regulation (EU) 2018/1023 of 23 July 2018 correcting implementing regulation (EU) 2017/2470 establishing the Union list of novel foods. *Off. J. Eur. Union*, *187*, 1-133.

Park, M. K., Jung, U., & Roh, C. (2011). Fucoidan from marine brown algae inhibits lipid accumulation. *Marine drugs*, *9*(8), 1359-1367.

Premarathna, A. D., Tuvikene, R., Fernando, P. H. P., Adhikari, R., Perera, M. C. N., Ranahewa, T. H., ... & Rajapakse, R. P. V. J. (2022). Comparative analysis of proximate compositions, mineral and functional chemical groups of 15 different seaweed species. *Scientific Reports*, *12*(1), 19610.

Potters, G., van Goethem, D., & Schutte, F. (2010). Promising biofuel resources: lignocellulose and algae. *Nature education*, *3*(9), 14.

Pereira, L., Ismail, G., & Abomohra, A. (2023). Algal biotechnology: Current trends and nanotechnology prospective. *Frontiers in Marine Science*.

Pereira, L., & Neto, J. M. (Eds.). (2014). *Marine algae: biodiversity, taxonomy, environmental assessment, and biotechnology*. CRC Press.

Pacheco-Quito, E. M., Ruiz-Caro, R., & Veiga, M. D. (2020). Carrageenan: drug delivery systems and other biomedical applications. *Marine Drugs*, 18(11), 583.

Pereira, A. G., Otero, P., Echave, J., Carreira-Casais, A., Chamorro, F., Collazo, N., ... & Prieto, M. A. (2021). Xanthophylls from the sea: Algae as source of bioactive carotenoids. *Marine drugs*, 19(4), 188.

Pierre, G., Graber, M., Rafiliposon, B. A., Dupuy, C., Orvain, F., De Crignis, M., & Maugard, T. (2012). Biochemical composition and changes of extracellular polysaccharides (ECPS) produced during microphytobenthic biofilm development (Marennes-Oléron, France). *Microbial ecology*, 63, 157-169.

Pena, M. J., Tuomivaara, S. T., Urbanowicz, B. R., O'Neill, M. A., & York, W. S. (2012). Methods for structural characterization of the products of cellulose-and xyloglucan-hydrolyzing enzymes. In *Methods in enzymology* (Vol. 510, pp. 121-139). Academic Press.

Pierre, G., Zhao, J. M., Orvain, F., Dupuy, C., Klein, G. L., Graber, M., & Maugard, T. (2014). Seasonal dynamics of extracellular polymeric substances (EPS) in surface sediments of a diatom-dominated intertidal mudflat (Marennes-Oléron, France). *Journal of sea research*, 92, 26-35.

Park, J. J., & Lee, W. Y. (2021). Anti-glycation effects of brown algae extracts and its phenolic compounds. *Food Bioscience*, 41, 101042.

Pereira, L. (2021). Macroalgae. *Encyclopedia*, 1, 177–188.

Philchenkov, A., Zavelevich, M., Imbs, T., Zvyagintseva, T., & Zaporozhets, T. (2007). Sensitization of human malignant lymphoid cells to etoposide by fucoidan, a brown seaweed polysaccharide. *Experimental Oncology*.

Pirsa, S., & Hafezi, K. (2022). Hydrocolloids: Structure, preparation method, and application in food industry. *Food Chemistry*, 133967.

Potters, G., van Goethem, D., & Schutte, F. (2010). Promising biofuel resources: lignocellulose and algae. *Nature education*, 3(9), 14.

Phillips, G. O., & Williams, P. A. (Eds.). (2009). *Handbook of hydrocolloids*. Elsevier.

Ponce, N. M., Pujol, C. A., Damonte, E. B., Flores, M. L., & Stortz, C. A. (2003). Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydrate Research*, 338(2), 153-165.

Puhari, S. S. M., Yuvaraj, S., Vasudevan, V., Ramprasath, T., Rajkumar, P., Arunkumar, K., ... & Selvam, G. S. (2022). Isolation and characterization of fucoidan from four brown algae and study of the cardioprotective effect of fucoidan from *Sargassum wightii* against high

glucose-induced oxidative stress in H9c2 cardiomyoblast cells. *Journal of Food Biochemistry*, e14412.

Pajot, A., Hao Huynh, G., Picot, L., Marchal, L., & Nicolau, E. (2022). Fucoxanthin from algae to human, an extraordinary bioresource: Insights and advances in up and downstream processes. *Marine drugs*, 20(4), 222.

Patel, A. K., Albarico, F. P. J. B., Perumal, P. K., Vadrane, A. P., Nian, C. T., Chau, H. T. B., ... & Singhania, R. R. (2022). Algae as an emerging source of bioactive pigments. *Bioresource Technology*, 351, 126910.

Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2011). Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of functional foods*, 3(4), 255-266.

Park, M. H., Nam, Y. H., & Han, J. S. (2015). Sargassum coreanum extract alleviates hyperglycemia and improves insulin resistance in db/db diabetic mice. *Nutrition Research and Practice*, 9(5), 472-479.

Patil, S. A., Gildemyn, S., Pant, D., Zengler, K., Logan, B. E., & Rabaey, K. (2015). A logical data representation framework for electricity-driven bioproduction processes. *Biotechnology advances*, 33(6), 736-744.

Priyanka, K. R., Rajaram, R., & Sivakumar, S. R. (2022). A critical review on pharmacological properties of marine macroalgae. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-25.

Perez Gutierrez, R. M. (2016). Antidiabetic and antioxidant properties, and α -amylase and α -glucosidase inhibition effects of triterpene saponins from *Piper auritum*. *Food science and biotechnology*, 25(1), 229-239.

Park, J. I., Lee, J., Sim, S. J., & Lee, J. H. (2009). Production of hydrogen from marine macro-algae biomass using anaerobic sewage sludge microflora. *Biotechnology and Bioengineering*, 14, 307-315.

Prokofjeva, M. M., Imbs, T. I., Shevchenko, N. M., Spirin, P. V., Horn, S., Fehse, B., ... & Prassolov, V. S. (2013). Fucoidans as potential inhibitors of HIV-1. *Marine Drugs*, 11(8), 3000-3014.

Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoa, A., & Vasconcelos, V. (2019). Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 37(3), 422-443.

Park, J. H., Choi, S. H., Park, S. J., Lee, Y. J., Park, J. H., Song, P. H., ... & Song, C. H. (2017). Promoting wound healing using low molecular weight fucoidan in a full-thickness dermal excision rat model. *Marine Drugs*, 15(4), 112.

Pawar, V. K., Singh, Y., Sharma, K., Shrivastav, A., Sharma, A., Singh, A., ... & Chourasia, M. K. (2019). Improved chemotherapy against breast cancer through immunotherapeutic activity of fucoidan decorated electrostatically assembled nanoparticles bearing doxorubicin. *International journal of biological macromolecules*, 122, 1100-1114.

Pereira, M. G., Benevides, N. M., Melo, M. R., Valente, A. P., Melo, F. R., & Mourão, P. A. (2005). Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action?. *Carbohydrate Research*, 340(12), 2015-2023.

Pérez Gastell, P. L., & Pérez de Alejo, J. L. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 29(3), 192-198.

Permatasari, a. a. a. p., Rosiana, i. w., Wiradana, p. a., Lestari, m. d., Widiastuti, n. k., Kurniawan, s. b., & Widhiantara, i. g. (2022). Extraction and characterization of sodium alginate from three brown algae collected from Sanur Coastal Waters, Bali as biopolymer agent. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(3).

Pierre, G., Sopena, V., Juin, C., Mastouri, A., Graber, M., & Maugard, T. (2011). Antibacterial activity of a sulfated galactan extracted from the marine alga *Chaetomorpha aerea* against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(5), 937-945.

Pradhan, B., Nayak, R., Patra, S., Bhuyan, P. P., Behera, P. K., Mandal, A. K., ... & Jena, M. (2022). A state-of-the-art review on fucoidan as an antiviral agent to combat viral infections. *Carbohydrate Polymers*, 119551.

Prajapati, V. D., Maheriya, P. M., Jani, G. K., & Solanki, H. K. (2014). RETRACTED: Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate polymers*, 105, 97-112.

Prince, M., Patel, V., Saxena, S., Maj, M., & Maselko, J. P. MR 2007. *No health without mental health*. *Lancet*, 370(9590), 859-877.

Pujol C.A., Errea M.I., Matulewicz M.C., Damonte E.B. Antiherpetic activity of S1, an algal derived sulphated galactan. *Phytother Res*. 1996;**10**:410–413. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199608)10:5<410::AID-PTR875>3.0.CO;2-K.

Qu, G., Liu, X., Wang, D., Yuan, Y. I., & Han, L. (2014). Isolation and characterization of fucoidans from five brown algae and evaluation of their antioxidant activity. *Journal of Ocean University of China*, 13, 851-856.

Qiu, S., Shen, Y., Wu, Z., Zhang, X., & Ge, S. (2021). Effects of algae subtype and extraction condition on extracted fucoxanthin antioxidant property: A 20-year meta-analysis. *Algal Research*, 53, 102161.

Queiroz, K. C. S., Medeiros, V. P., Queiroz, L. S., Abreu, L. R. D., Rocha, H. A. O., Ferreira, C. V., ... & Leite, E. L. (2008). Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(5), 303-307.

Quentin, F., Gallet, P. F., Guilloton, M., & Quintard, B. (2011). *Biochimie en 83 fiches*. Dunod.

Qin, Y., Jiang, J., Zhao, L., Zhang, J., & Wang, F. (2018). Applications of alginate as a functional food ingredient. In *Biopolymers for food design* (pp. 409-429). Academic Press.

Raghavendran, H. R. B., Sathivel, A., & Devaki, T. (2005). Effect of *Sargassum polycystum* (Phaeophyceae)-sulphated polysaccharide extract against acetaminophen-induced hyperlipidemia during toxic hepatitis in experimental rats. *Molecular and cellular biochemistry*, 276, 89-96.

Rostami, Z., Tabarsa, M., You, S., & Rezaei, M. (2017). Relationship between molecular weights and biological properties of alginates extracted under different methods from *Colpomenia peregrina*. *Process Biochemistry*, 58, 289-297.

Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 2014.

Roberta, T., Maria, R. C., Daniela, R., Tiziana, A., Sebastiano, C., Milani, R. M., ... & Miriam, B. (1993). Effect of the desulfation of heparin on its anticoagulant and anti-proliferative activity. *Thrombosis Research*, 70, 99-106.

Ryu, Y. B., Jeong, H. J., Yoon, S. Y., Park, J. Y., Kim, Y. M., Park, S. J., ... & Lee, W. S. (2011). Influenza virus neuraminidase inhibitory activity of phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia cava*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(12), 6467-6473.

Rosell, K. G., & Srivastava, L. M. (1984). Seasonal variation in the chemical constituents of the brown algae *Macrocystis integrifolia* and *Nereocystis luetkeana*. *Canadian journal of botany*, 62(11), 2229-2236.

Ravanal, M. C., Sharma, S., Gimpel, J., Reveco-Urzu, F. E., Øverland, M., Horn, S. J., & Lienqueo, M. E. (2017). The role of alginate lyases in the enzymatic saccharification of brown macroalgae, *Macrocystis pyrifera* and *Saccharina latissima*. *Algal research*, 26, 287-293.

Ramola, B., Kumar, V., Nanda, M., Mishra, Y., Tyagi, T., Gupta, A., & Sharma, N. (2019). Evaluation, comparison of different solvent extraction, cell disruption methods and hydrothermal liquefaction of *Oedogonium* macroalgae for biofuel production. *Biotechnology Reports*, 22, e00340.

Ramakrishnan, M. A. (2016). Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World journal of virology*, 5(2), 85.

Rosic, N., Climstein, M., Boyle, G. M., Thanh Nguyen, D., & Feng, Y. (2023). Exploring Mycosporine-like Amino Acid UV-Absorbing Natural Products for a New Generation of Environmentally Friendly Sunscreens. *Marine drugs*, 21(4), 253.

Rockwell, N. C., Lagarias, J. C., & Bhattacharya, D. (2014). Primary endosymbiosis and the evolution of light and oxygen sensing in photosynthetic eukaryotes. *Frontiers in ecology and evolution*, 2, 66.

Rhein-Knudsen, N., Ale, M. T., & Meyer, A. S. (2015). Seaweed hydrocolloid production: an update on enzyme assisted extraction and modification technologies. *Marine drugs*, 13(6), 3340-3359.

Raveendran, S., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Kumar, D. S. (2013). Pharmaceutically versatile sulfated polysaccharide based bionano platforms. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(5), 605-626.

Rioux, L. E., Turgeon, S. L., & Beaulieu, M. (2007). Rheological characterisation of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(9), 1630-1638.

Roglic, G., Unwin, N., Bennett, P. H., Mathers, C., Tuomilehto, J., Nag, S., ... & King, H. (2005). The Burden of Mortality Attributable to Diabetes: Realistic estimates for the year 2000. *Diabetes care*, 28(9), 2130-2135.

Ramirez, L. (2013). *Production de bio-carburants de 3ème génération à partir de microalgues* (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I).

Ruiz, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2013). Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 21, 35-51.

Ra, C. H., Sunwoo, I. Y., & Kim, S. K. (2016). Bioethanol production from macroalgal biomass. *Journal of life science*, 26(8), 976-982.

Rejaibi, S., Zoghalami, N., Silini, A., Ben Slama, I., Skhiri, A., Mariem, I., ... & Aounallah-Skhiri, H. (2022). Leading causes of death in Tunisia, 2020: Salsabil Rejaibi. *European Journal of Public Health*, 32(Supplement_3), ckac131-218.

Rahelivao, M. P., Andriamanantoanina, H., Heyraud, A., & Rinaudo, M. (2013). Structure and properties of three alginates from Madagascar seacoast algae. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 143-146.

Rai, D., Adelman, A. S., Zhuang, W., Rai, G. P., Boettcher, J., & Lönnerdal, B. (2014). Longitudinal changes in lactoferrin concentrations in human milk: a global systematic review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(12), 1539-1547.

Rajput, V. D., Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R., Meena, M., ... & Mandzhieva, S. (2021). Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology*, 10(4), 267.

Recalde, M. P., Nosedá, M. D., Pujol, C. A., Carlucci, M. J., & Matulewicz, M. C. (2009). Sulfated mannans from the red seaweed *Nemalion helminthoides* of the South Atlantic. *Phytochemistry*, 70(8), 1062-1068.

Rodríguez-Gacio, M. D. C., Iglesias-Fernández, R., Carbonero, P., & Matilla, Á. J. (2012). Softening-up mannan-rich cell walls. *Journal of Experimental Botany*, 63(11), 3976-3988.

Ribeiro, R. A., Vale, M. L., Thomazzi, S. M., Paschoalato, A. B., Poole, S., Ferreira, S. H., & Cunha, F. Q. (2000). Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing

nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European journal of pharmacology*, 387(1), 111-118.

Rice, P. J., Adams, E. L., Ozment-Skelton, T., Gonzalez, A. J., Goldman, M. P., Lockhart, B. E., ... & Williams, D. L. (2005). Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(3), 1079-1086.

Rodrigo-Baños, M., Garbayo, I., Vílchez, C., Bonete, M. J., & Martínez-Espinosa, R. M. (2015). Carotenoids from Haloarchaea and their potential in biotechnology. *Marine drugs*, 13(9), 5508-5532.

Rodrigues, J. A., de Vanderlei, E. S., Silva, L. M., de Araújo, I. W., de Queiroz, I. N., de Paula, G. A., ... & Benevides, N. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. *Pharmacological Reports*, 64(2), 282-292.

Saberi Riseh, R., Gholizadeh Vazvani, M., Ebrahimi-Zarandi, M., & Skorik, Y. A. (2022). Alginate-induced disease resistance in plants. *Polymers*, 14(4), 661.

Silva, A., Rodrigues, C., Garcia-Oliveira, P., Lourenço-Lopes, C., Silva, S. A., Garcia-Perez, P., ... & Prieto, M. A. (2021). Screening of bioactive properties in brown algae from the northwest iberian peninsula. *Foods*, 10(8), 1915.

Sorteberg, H. G. O. (2019). PEGASUS-Phycomorph European Guidelines for a Sustainable Aquaculture of Seaweeds.

Sonia, K., Meena, K. S., & Rajesh, D. (2021). Structural characterization, biological evaluation and molecular docking studies of fucoidan isolated from brown marine algae. *Journal of Advanced Scientific Research*, 12(04 Suppl 1), 90-100.

Singhania, R. R., Christophe, G., Perchet, G., Troquet, J., & Larroche, C. (2012). Immersed membrane bioreactors: an overview with special emphasis on anaerobic bioprocesses. *Bioresource technology*, 122, 171-180.

Størseth, T. R., Chauton, M. S., & Krane, J. (2006). HR MAS NMR Spectroscopy of Marine Microalgae, Part 2: ¹³C and ¹³C HR MAS NMR Analysis Used to Study Fatty Acid Composition and Polysaccharide Structure. *Modern Magnetic Resonance*, 953-957.

Schittenhelm, N., & Kulicke, W. M. (2000). Producing homologous series of molar masses for establishing structure-property relationships with the aid of ultrasonic degradation. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 201(15), 1976-1984.

Smith, A. L., Klenk, N., Wood, S., Hewitt, N., Henriques, I., Yan, N., & Bazely, D. R. (2013). Second generation biofuels and bioinvasions: An evaluation of invasive risks and policy responses in the United States and Canada. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 30-42.

- Sun, Q. L., Li, Y., Ni, L. Q., Li, Y. X., Cui, Y. S., Jiang, S. L., ... & Dong, C. X. (2020). Structural characterization and antiviral activity of two fucoidans from the brown algae *Sargassum henslowianum*. *Carbohydrate polymers*, 229, 115487.
- Sellimi, S., Kadri, N., Barragan-Montero, V., Laouer, H., Hajji, M., & Nasri, M. (2014). Fucans from a Tunisian brown seaweed *Cystoseira barbata*: Structural characteristics and antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 66, 281-288.
- Sun, P., Wong, C. C., Li, Y., He, Y., Mao, X., Wu, T., ... & Chen, F. (2019). A novel strategy for isolation and purification of fucoxanthinol and fucoxanthin from the diatom *Nitzschia laevis*. *Food chemistry*, 277, 566-572.
- Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., Magalhães, P. O., & Silveira, D. (2012). α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 141-183.
- Suutari, M., Leskinen, E., Fagerstedt, K., Kuparinen, J., Kuuppo, P., & Blomster, J. (2015). Macroalgae in biofuel production. *Phycological Research*, 63(1), 1-18.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Soyez, K. (1995). Integrated design of a fermentation plant. The production of Baker's yeast. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1994 XIV, 86 pages, 12 figures, 6 tables; DM 98,-(£ 16.95) ISBN 3-527-30029-5.
- Sen, S., Chakraborty, R., Maramsa, N., Basak, M., Deka, S., & Dey, B. K. (2015). In vitro anti-inflammatory activity of *Amaranthus caudatus* L. leaves.
- Strugala, V., Kennington, E. J., Campbell, R. J., Skjåk-Bræk, G., & Dettmar, P. W. (2005). Inhibition of pepsin activity by alginates in vitro and the effect of epimerization. *International journal of pharmaceuticals*, 304(1-2), 40-50.
- Santelices, B. (1991). Production ecology of *Gelidium*. *Hydrobiologia*, 221(1), 31-44.
- Sarker, S., Akter, M., Rahman, M. S., Islam, M. M., Hasan, O., Kabir, M. A., & Rahman, M. M. (2021). Spatial prediction of seaweed habitat for mariculture in the coastal area of Bangladesh using a Generalized Additive Model. *Algal Research*, 60, 102490.
- Stiger-Pouvreau, V., & Zubia, M. (2020). Macroalgal diversity for sustainable biotechnological development in French tropical overseas territories. *Botanica marina*, 63(1), 17-41.
- Somerville, C. (2006). Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 53-78.
- Silva, V. A. J., Andrade, P. L., Silva, M. P. C., Valladares, L. D. L. S., & Aguiar, J. A. (2013). Synthesis and characterization of Fe₃O₄ nanoparticles coated with fucan polysaccharides. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 343, 138-143.

Snook, J. T. (1968). Effect of diet, adrenalectomy, diabetes, and actinomycin D on exocrine pancreas. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 215(6), 1329-1333.

She, C., Shang, F., Zhou, K., & Liu, N. (2017). Serum carotenoids and risks of diabetes and diabetic retinopathy in a Chinese population sample. *Current molecular medicine*, 17(4), 287-297.

Sikkema, R., Proskurina, S., Banja, M., & Vakkilainen, E. (2021). How can solid biomass contribute to the EU's renewable energy targets in 2020, 2030 and what are the GHG drivers and safeguards in energy-and forestry sectors?. *Renewable Energy*, 165, 758-772.

Smichi, N., Messaoudi, Y., Moujahed, N., Messaoud, C., Langar, H., Bezzarga, M., & Gargouri, M. (2022). Assessment of macroalgal biomass potential in Tunisia for bioethanol production.

Sivaramakrishnan, R., Suresh, S., Kanwal, S., Ramadoss, G., Ramprakash, B., & Incharoensakdi, A. (2022). Microalgal biorefinery concepts' developments for biofuel and bioproducts: Current perspective and bottlenecks. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2623.

Saengsawang, B., Bhuyar, P., Manmai, N., Ponnusamy, V. K., Ramaraj, R., & Unpaprom, Y. (2020). The optimization of oil extraction from macroalgae, *Rhizoclonium* sp. by chemical methods for efficient conversion into biodiesel. *Fuel*, 274, 117841.

Sorgulu, F., & Dincer, I. (2022). Development and assessment of renewable hydrogen production and natural gas blending systems for use in different locations. *Energy Science & Engineering*, 10(5), 1739-1751.

Sudhakar, M. P., Arunkumar, K., & Perumal, K. (2020). Pretreatment and process optimization of spent seaweed biomass (SSB) for bioethanol production using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Renewable Energy*, 153, 456-471.

Schultz-Jensen, N., Thygesen, A., Leipold, F., Thomsen, S. T., Roslander, C., Lilholt, H., & Bjerre, A. B. (2013). Pretreatment of the macroalgae *Chaetomorpha linum* for the production of bioethanol—comparison of five pretreatment technologies. *Bioresource technology*, 140, 36-42.

Soliman, R. M., Younis, S. A., El-Gendy, N. S., Mostafa, S. S. M., El-Temtamy, S. A., & Hashim, A. I. (2018). Batch bioethanol production via the biological and chemical saccharification of some Egyptian marine macroalgae. *Journal of applied microbiology*, 125(2), 422-440.

Su, X., Zhao, W., & Xia, D. (2018). The diversity of hydrogen-producing bacteria and methanogens within an in situ coal seam. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1-18.

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., & Roessler, P. (1998). A look back at the US Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. *National Renewable Energy Laboratory*, 328, 1-294.

Smith, A. L., Klenk, N., Wood, S., Hewitt, N., Henriques, I., Yan, N., & Bazely, D. R. (2013). Second generation biofuels and bioinvasions: An evaluation of invasive risks and policy responses in the United States and Canada. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 30-42.

Said, R., Romdhane, M., El Abed, A., & M'rabet, R. (2009). La rhodophycée *Gelidium spinosum* (SG Gmelin) PC Silva, des côtes de Monastir (Tunisie): quelques éléments hydrobiologiques et potentialités en agar-agar. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 5(1).

Sellimi, S., Younes, I., Ayed, H. B., Maalej, H., Montero, V., Rinaudo, M., ... & Nasri, M. (2015). Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1358-1367.

Salachna, P., Grzeszczuk, M., Meller, E., & Soból, M. (2018). Oligo-alginate with low molecular mass improves growth and physiological activity of *Eucomis autumnalis* under salinity stress. *Molecules*, 23(4), 812.

Sandybayeva, S. K., Kossalbayev, B. D., Zayadan, B. K., Sadvakasova, A. K., Bolatkhan, K., Zadneprovskaya, E. V., ... & Chang, J. S. (2022). Prospects of cyanobacterial pigment production: Biotechnological potential and optimization strategies. *Biochemical Engineering Journal*, 187, 108640.

Sari-Chmayssem, N., Taha, S., Mawlawi, H., Guégan, J. P., Jeftić, J., & Benvegna, T. (2016). Extracted and depolymerized alginates from brown algae *Sargassum vulgare* of Lebanese origin: Chemical, rheological, and antioxidant properties. *Journal of Applied Phycology*, 28, 1915-1929.

Sekine, H., Ohonuki, N., Sadamasu, K., Monma, K., Kudoh, Y., Nakamura, h., ... & Okuyama, T. (1995). The Inhibitory Effect of the Crude Extract from a Seaweed of *Dygenea simplex*.

Sepúlveda-Crespo, D., Ceña-Díez, R., Jiménez, J. L., & Ángeles Muñoz-Fernández, M. (2017). Mechanistic studies of viral entry: an overview of dendrimer-based microbicides as entry inhibitors against both HIV and HSV-2 overlapped infections. *Medicinal research reviews*, 37(1), 149-179.

Sezer, A. D., Hatipoglu, F., Cevher, E., Oğurtan, Z., Bas, A. L., & Akbuğa, J. (2007). Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro/in vivo evaluation. *Aaps Pharmscitech*, 8, E94-E101.

Shanmugam, M., & Mody, K. H. (2000). Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current science*, 1672-1683.

Shanmugam, M., Mody, K. H., Ramavat, B. K., Murthy, A., & Siddhanta, A. K. (2002). Screening of Codiacean algae (Chlorophyta) of the Indian coasts for blood anticoagulant activity.

Shanthi, N., Arumugam, P., Murugan, M., Sudhakar, M. P., & Arunkumar, K. (2021). Extraction of fucoidan from *Turbinaria decurrens* and the synthesis of fucoidan-coated AgNPs for anticoagulant application. *ACS omega*, 6(46), 30998-31008.

Shen, S., Chen, X., Shen, Z., & Chen, H. (2021). Marine polysaccharides for wound dressings application: An overview. *Pharmaceutics*, 13(10), 1666.

Subaraja, M., Krishnan, D. A., Hillary, V. E., Raja, T. R. W., Mathew, P., RaviKumar, S., ... & Ignacimuthu, S. (2020). Fucoidan serves a neuroprotective effect in an Alzheimer's disease model. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 12(1), 1-34.

Sun, T., Zhang, X., Miao, Y., Zhou, Y., Shi, J., Yan, M., & Chen, A. (2018). Studies on antiviral and immuno-regulation activity of low molecular weight fucoidan from *Laminaria japonica*. *Journal of Ocean University of China*, 17, 705-711.

Tapiero, H., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58(2), 100-110.

Toyama, M. H., Toyama, D. O., Torres, V. M., Pontes, G. C., Farias, W. R. L., Melo, F. R., ... & Cavada, B. S. (2010). Effects of low molecular weight sulfated galactan fragments from *Botryocladia occidentalis* on the pharmacological and enzymatic activity of sPLA2 from *Crotalus durissus cascavella*. *The protein journal*, 29, 567-571.

Tanna, B., & Mishra, A. (2019). Nutraceutical potential of seaweed polysaccharides: Structure, bioactivity, safety, and toxicity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(3), 817-831.

Tan, I. S., Lam, M. K., Foo, H. C. Y., Lim, S., & Lee, K. T. (2020). Advances of macroalgae biomass for the third generation of bioethanol production. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 28(2), 502-517.

Torres, M. D., Flórez-Fernández, N., & Domínguez, H. (2019). Integral utilization of red seaweed for bioactive production. *Marine drugs*, 17(6), 314.

Tsou, M. H., Lee, C. C., Wu, Z. Y., Lee, Z. H., & Lin, H. M. (2022). Bioactivity of crude fucoidan extracted from *Sargassum ilicifolium* (Turner) C. Agardh. *Scientific Reports*, 12(1), 15916.

Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D. P., Kaul, S., & Garg, M. O. (2015). Algae based biorefinery—how to make sense?. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 295-307.

Torres, M. R., Sousa, A. P., Silva Filho, E. A., Melo, D. F., Feitosa, J. P., de Paula, R. C., & Lima, M. G. (2007). Extraction and physicochemical characterization of *Sargassum vulgare* alginate from Brazil. *Carbohydrate research*, 342(14), 2067-2074.

Tedesco, S., Barroso, T. M., & Olabi, A. G. (2014). Optimization of mechanical pre-treatment of *Laminariaceae* spp. biomass-derived biogas. *Renewable Energy*, 62, 527-534.

Trang, V. T. D., Mikkelsen, M. D., Vuillemin, M., Meier, S., Cao, H. T. T., Muschiol, J., ... & Meyer, A. S. (2022). The endo- α (1, 4) specific fucoidanase Fhf2 from *Formosa haliotis* releases highly sulfated fucoidan oligosaccharides. *Frontiers in Plant Science*, 29.

Takano, R., Iwane-Sakata, H., Hayashi, K., Hara, S., & Hirase, S. (1998). Concurrence of agaroid and carrageenan chains in funoran from the red seaweed *Gloiopeltis furcata* Post. et Ruprecht (Cryptonemiales, Rhodophyta). *Carbohydrate Polymers*, 35(1-2), 81-87.

Thompson, T. M., Young, B. R., & Baroutian, S. (2019). Advances in the pretreatment of brown macroalgae for biogas production. *Fuel Processing Technology*, 195, 106151.

Tsuge, K., Okabe, M., Yoshimura, T., Sumi, T., Tachibana, H., & Yamada, K. (2007). Dietary effects of porphyran from *Porphyra yezoensis* on growth and lipid metabolism of Sprague-Dawley rats. *Food Science and Technology Research*, 10(2), 147-151.

Uma, V. S., Usmani, Z., Sharma, M., Diwan, D., Sharma, M., Guo, M., ... & Gupta, V. K. (2022). Valorisation of algal biomass to value-added metabolites: Emerging trends and opportunities. *Phytochemistry Reviews*, 1-26.

ul Haq, S., Khan, A., Ali, M., Khattak, A. M., Gai, W. X., Zhang, H. X., ... & Gong, Z. H. (2019). Heat shock proteins: dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses. *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5321.

Urbanova, M., Pavelkova, M., Czernek, J., Kubova, K., Vyslouzil, J., Pechova, A., ... & Brus, J. (2019). Interaction pathways and structure–chemical transformations of alginate gels in physiological environments. *Biomacromolecules*, 20(11), 4158-4170.

Usoltseva, R. V., Shevchenko, N. M., Malyarenko, O. S., Anastyuk, S. D., Kaspruk, A. E., Zvyagintsev, N. V., & Ermakova, S. P. (2019). Fucoidans from brown algae *Laminaria longipes* and *Saccharina cichorioides*: Structural characteristics, anticancer and radiosensitizing activity in vitro. *Carbohydrate polymers*, 221, 157-165.

Ungureanu, N., Vladut, V., & Biris, S. S. (2020, May). Capitalization of wastewater-grown algae in bioethanol production. In *Proceedings of the 19th International Scientific Conference, Jelgava, Latvia* (pp. 20-22).

Usman, B., Sharma, N., Satija, S., Mehta, M., Vyas, M., Khatik, G. L., ... & Dua, K. (2019). Recent developments in alpha-glucosidase inhibitors for management of type-2 diabetes: An update. *Current pharmaceutical design*, 25(23), 2510-2525.

Ustyuzhanina, N. E., Ushakova, N. A., Zyuzina, K. A., Bilan, M. I., Elizarova, A. L., Somonova, O. V., ... & Nifantiev, N. E. (2013). Influence of fucoidans on hemostatic system. *Marine drugs*, 11(7), 2444-2458.

Vaiserman, A. (2015). Kh. Muradian, A. Vaiserman, K.-J. Min b, VE Fraifeld c.

Vaitkute, G., Panic, G., Alber, D. G., Faizura-Yeop, I., Cloutman-Green, E., Swann, J., ... & Bajaj-Elliott, M. (2022). Linking gastrointestinal microbiota and metabolome dynamics to

clinical outcomes in paediatric haematopoietic stem cell transplantation. *Microbiome*, 10(1), 89.

Verma, M. S., & Gu, F. X. (2012). 1, 3-Beta-Glucans: Drug Delivery and Pharmacology. In *The complex world of polysaccharides*. IntechOpen.

Vickers, N. J. (2017). Animal communication: when i'm calling you, will you answer too?. *Current biology*, 27(14), R713-R715.

Villela Romanos, M. T., Andrada-Serpa, M. J., Matos dos Santos, M. G., F. Ribeiro, A. C., Yoneshigue-Valentin, Y., Soares Costa, S., & Dutra Wigg, M. (2002). Inhibitory effect of extracts of Brazilian marine algae on human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation in vitro. *Cancer investigation*, 20(1), 46-54.

Viñas-Ospino, A., López-Malo, D., Esteve, M. J., Frígola, A., & Blesa, J. (2023). Green solvents: Emerging alternatives for carotenoid extraction from fruit and vegetable by-products. *Foods*, 12(4), 863.

Wells, M. L., Potin, P., Craigie, J. S., Raven, J. A., Merchant, S. S., Helliwell, K. E., ... & Brawley, S. H. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of applied phycology*, 29, 949-982.

Wang, Y., Xing, M., Cao, Q., Ji, A., Liang, H., & Song, S. (2019). Biological activities of fucoidan and the factors mediating its therapeutic effects: A review of recent studies. *Marine Drugs*, 17(3), 183.

Wahl, M., Molis, M., Hobday, A., Dudgeon, S. R., Neumann, R., Steinberg, P., ... & Connell, S. D. (2015). The responses of brown macroalgae to environmental change from local to global scales: Direct and ecologically mediated effects. *Perspectives in Phycology*, 2(1), 11-30.

Wibowo, A. D. K. (2013). Study on production process of biodiesel from rubber seed (hevea brasiliensis) by in situ (trans) esterification method with acid catalyst. *Energy Procedia*, 32, 64-73.

Wang, H., Wang, X., & Wu, D. (2022). Recent Advances of Natural Polysaccharide-based Double-network Hydrogels for Tissue Repair. *Chemistry—An Asian Journal*, 17(17), e202200659.

Wang, M., & Cheong, K. L. (2023). Preparation, structural characterisation, and bioactivities of fructans: A review. *Molecules*, 28(4), 1613.

Wang, L., Wang, X., Wu, H., & Liu, R. (2014). Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. *Marine Drugs*, 12(9), 4984-5020.

Wang, Q., Song, Y., He, Y., Ren, D., Kow, F., Qiao, Z., ... & Yu, X. (2014). Structural characterisation of algae *Costaria costata* fucoidan and its effects on CCl₄-induced liver injury. *Carbohydrate polymers*, 107, 247-254.

Wang, J., Wang, F., Zhang, Q., Zhang, Z., Shi, X., & Li, P. (2009). Synthesized different derivatives of low molecular fucoidan extracted from *Laminaria japonica* and their potential

antioxidant activity in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44(5), 379-384.

Wen, Y., Gao, L., Zhou, H., Ai, C., Huang, X., Wang, M., ... & Zhao, C. (2021). Opportunities and challenges of algal fucoidan for diabetes management. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 628-641.

Wei, Q., Fu, G., Wang, K., Yang, Q., Zhao, J., Wang, Y., ... & Song, S. (2022). Advances in research on antiviral activities of sulfated polysaccharides from seaweeds. *Pharmaceuticals*, 15(5), 581.

Wang, L., Li, S., Yu, W., & Gong, Q. (2015). Cloning, overexpression and characterization of a new oligoalginate lyase from a marine bacterium, *Shewanella* sp. *Biotechnology letters*, 37, 665-671.

Wang, S., Wei, X., Zhou, J., Zhang, J., Li, K., Chen, Q., ... & Wei, L. (2014). Identification of $\alpha 2$ -macroglobulin as a master inhibitor of cartilage-degrading factors that attenuates the progression of posttraumatic osteoarthritis. *Arthritis & rheumatology*, 66(7), 1843-1853.

Waffenschmidt, S., & Jaenicke, L. (1987). Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2, 2'-bicinchoninate. *Analytical biochemistry*, 165(2), 337-340.

Wijesinghe, W. A. J. P., & Jeon, Y. J. (2012). Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 13-20.

World Health Organization. (2016). World Health Organization Global Report on Diabetes. *Geneva: World Health Organization*.

Wargacki, A. J., Leonard, E., Win, M. N., Regitsky, D. D., Santos, C. N. S., Kim, P. B., ... & Yoshikuni, Y. (2012). An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science*, 335(6066), 308-313.

World Bank. (2019). *Strengthening Hydromet and Early Warning Systems and Services in Georgia: A Road Map*. World Bank.

Wijesinghe, W. A. J. P., & Jeon, Y. J. (2012). Exploiting biological activities of brown seaweed *Ecklonia cava* for potential industrial applications: a review. *International journal of food sciences and nutrition*, 63(2), 225-235.

Wang, C. Y., Liu, X., Guo, L. M., Shao, C. L., Fang, Y. C., Wei, Y. X., ... & Guan, H. S. (2010). Two new natural keto-acid derivatives from *Sargassum pallidum*. *Chemistry of natural compounds*, 46, 292-294.

Wang, M., Hettiarachchy, N. S., Qi, M., Burks, W., & Siebenmorgen, T. (1999). Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(2), 411-416.

Wang, W., Wang, S. X., & Guan, H. S. (2012). The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: an overview. *Marine drugs*, 10(12), 2795-2816.

Wang, Y., Han, F., Hu, B., Li, J., & Yu, W. (2006). In vivo prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate. *Nutrition Research*, 26(11), 597-603.

Weber, D., Jenq, R. R., Peled, J. U., Taur, Y., Hiergeist, A., Koestler, J., ... & Holler, E. (2017). Microbiota disruption induced by early use of broad-spectrum antibiotics is an independent risk factor of outcome after allogeneic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 23(5), 845-852.

Winther-Larsen, A., Sandfeld-Paulsen, B., & Hvas, A. M. (2022, April). New insights in coagulation and fibrinolysis in patients with primary brain cancer: a systematic review. In *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* (Vol. 48, No. 03, pp. 323-337). Thieme Medical Publishers, Inc.

Xu, S. Y., He, P. Q., Dewi, S. Z., Zhang, X. L., Ekowati, C., Liu, T. J., & Huang, X. H. (2013). Hydrogen-producing microflora and Fe-Fe hydrogenase diversities in seaweed bed associated with marine hot springs of Kalianda, Indonesia. *Current microbiology*, 66, 499-506.

Xing, Q., An, D., Zheng, X., Wei, Z., Wang, X., Li, L., ... & Chen, J. (2019). Monitoring seaweed aquaculture in the Yellow Sea with multiple sensors for managing the disaster of macroalgal blooms. *Remote Sensing of Environment*, 231, 111279.

Xiao, H., Zhao, J., Fang, C., Cao, Q., Xing, M., Li, X., ... & Song, S. (2020). Advances in studies on the pharmacological activities of fucoxanthin. *Marine drugs*, 18(12), 634.

Xing, M., Cao, Q., Wang, Y., Xiao, H., Zhao, J., Zhang, Q., ... & Song, S. (2020). Advances in research on the bioactivity of alginate oligosaccharides. *Marine drugs*, 18(3), 144.

Xin, M., Ren, L., Sun, Y., Li, H. H., Guan, H. S., He, X. X., & Li, C. X. (2016). Anticoagulant and antithrombotic activities of low-molecular-weight propylene glycol alginate sodium sulfate (PSS). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 114, 33-40.

Xia, A., Jacob, A., Herrmann, C., Tabassum, M. R., & Murphy, J. D. (2015). Production of hydrogen, ethanol and volatile fatty acids from the seaweed carbohydrate mannitol. *Bioresource Technology*, 193, 488-497.

Yusuf, E., Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Nowicka, P. (2021). Nutritional, phytochemical characteristics and in vitro effect on α -amylase, α -glucosidase, lipase, and cholinesterase activities of 12 coloured carrot varieties. *Foods*, 10(4), 808.

Yan, R., Li, S. L., Chung, H. S., Tam, Y. K., & Lin, G. (2005). Simultaneous quantification of 12 bioactive components of *Ligusticum chuanxiong* Hort. by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(1), 87-95.

Yoon, S. J., Pereira, M. S., Pavão, M. S., Hwang, J. K., Pyun, Y. R., & Mourão, P. A. (2002). The medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. *Thrombosis research*, 106(1), 51-58.

Yuan, Y., Zhang, J., Fan, J., Clark, J., Shen, P., Li, Y., & Zhang, C. (2018). Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four economic brown macroalgae species and evaluation of their antioxidant activities and inhibitory effects on α -amylase, α -glucosidase, pancreatic lipase and tyrosinase. *Food Research International*, 113, 288-297.

Yuan, H., Song, J., Li, X., Li, N., & Dai, J. (2006). Immunomodulation and antitumor activity of κ -carrageenan oligosaccharides. *Cancer letters*, 243(2), 228-234.

Yapo, B. M., Lerouge, P., Thibault, J. F., & Ralet, M. C. (2007). Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers*, 69(3), 426-435.

Yun, E. J., Lee, S., Kim, J. H., Kim, B. B., Kim, H. T., Lee, S. H., ... & Kim, K. H. (2013). Enzymatic production of 3, 6-anhydro-L-galactose from agarose and its purification and in vitro skin whitening and anti-inflammatory activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 2961-2970.

Yu, J., Li, Q., Wu, J., Yang, X., Yang, S., Zhu, W., ... & Lu, J. (2021). Fucoidan Extracted From Sporophyll of *Undaria pinnatifida* Grown in Weihai, China—Chemical Composition and Comparison of Antioxidant Activity of Different Molecular Weight Fractions. *Frontiers in Nutrition*, 8, 636930.

Yosae, S., Fakhrabadi, M. A., & Shidfar, F. (2016). Positive evidence for vitamin A role in prevention of type 1 diabetes. *World journal of diabetes*, 7(9), 177.

Yanagisawa, M., Nakamura, K., Ariga, O., & Nakasaki, K. (2011). Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides. *Process Biochemistry*, 46(11), 2111-2116.

Yamashita, S., Sugita-konishi, Y., & Shimizu, M. (2001). In vitro bacteriostatic effects of dietary polysaccharides. *Food Science and Technology Research*, 7(3), 262-264.

Yang, D., & Jones, K. S. (2009). Effect of alginate on innate immune activation of macrophages. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 90(2), 411-418.

Yao, L., Yang, P., Lin, Y., Bi, D., Yu, B., Lin, Z., ... & Xu, X. (2021). The regulatory effect of alginate on ovalbumin-induced gut microbiota disorders. *Journal of Functional Foods*, 86, 104727.

You, L., Gong, Y., Li, L., Hu, X., Brennan, C., & Kulikouskaya, V. (2020). Beneficial effects of three brown seaweed polysaccharides on gut microbiota and their structural characteristics: An overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(3), 1199-1206.

Young, A. T., Kang, J. H., Kang, D. J., Venkatesan, J., Chang, H. K., Bhatnagar, I., ... & Kim, D. G. (2016). Interaction of stem cells with nano hydroxyapatite-fucoidan

bionanocomposites for bone tissue regeneration. *International journal of biological macromolecules*, 93, 1488-1491.

Yu, B., Bi, D., Yao, L., Li, T., Gu, L., Xu, H., ... & Xu, X. (2020). The inhibitory activity of alginate against allergic reactions in an ovalbumin-induced mouse model. *Food & function*, 11(3), 2704-2713.

Yuan, Y., & Macquarrie, D. (2015). Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydrate polymers*, 129, 101-107.

Ye, H., Wang, K., Zhou, C., Liu, J., & Zeng, X. (2008). Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chemistry*, 111(2), 428-432.

Yu, L., Xue, C., Chang, Y., Hu, Y., Xu, X., Ge, L., & Liu, G. (2015). Structure and rheological characteristics of fucoidan from sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Food Chemistry*, 180, 71-76.

Zhang, H., Cheng, J., & Ao, Q. (2021). Preparation of alginate-based biomaterials and their applications in biomedicine. *Marine Drugs*, 19(5), 264.

Zeng, J., Luan, F., Hu, J., Liu, Y., Zhang, X., Qin, T., ... & Zeng, N. (2022). Recent research advances in polysaccharides from *Undaria pinnatifida*: Isolation, structures, bioactivities, and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Zhang, F. Q., Wang, B., Xu, Y. J., Li, P., Liu, Y., & Zhu, P. (2020). Convenient blending of alginate fibers with polyamide fibers for flame-retardant non-woven fabrics. *Cellulose*, 27, 8341-8349.

Zhang, H., Cheng, J., & Ao, Q. (2021). Preparation of alginate-based biomaterials and their applications in biomedicine. *Marine Drugs*, 19(5), 264.

Zhang, Z., Zhang, Q., Wang, J., Song, H., Zhang, H., & Niu, X. (2010). Regioselective syntheses of sulfated porphyrans from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant and anticoagulant activities in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 79(4), 1124-1129.

Zhang, H., Tang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qu, J., Wang, X., ... & Liu, Z. (2015). Fucoxanthin: A promising medicinal and nutritional ingredient. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2015.

Zava, T. T., & Zava, D. T. (2011). Assessment of Japanese iodine intake based on seaweed consumption in Japan: a literature-based analysis. *Thyroid research*, 4(1), 14.

Zayed, A., Avila-Peltroche, J., El-Aasr, M., & Ulber, R. (2022). Sulfated galactofucans: An outstanding class of fucoidans with promising bioactivities. *Marine Drugs*, 20(7), 412.

Zayed, A., & Ulber, R. (2020). Fucoidans: Downstream processes and recent applications. *Marine drugs*, 18(3), 170.

Zanchetta, E., Damergi, E., Patel, B., Borgmeyer, T., Pick, H., Pulgarin, A., & Ludwig, C. (2021). Algal cellulose, production and potential use in plastics: Challenges and opportunities. *Algal Research*, 56, 102288.

Zhang, H., Tang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qu, J., Wang, X., ... & Liu, Z. (2015). Fucoxanthin: A promising medicinal and nutritional ingredient. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2015.

Zaharudin, N., Staerk, D., & Dragsted, L. O. (2019). Inhibition of α -glucosidase activity by selected edible seaweeds and fucoxanthin. *Food Chemistry*, 270, 481-486.

Zeng, J., Luan, F., Hu, J., Liu, Y., Zhang, X., Qin, T., ... & Zeng, N. (2022). Recent research advances in polysaccharides from *Undaria pinnatifida*: Isolation, structures, bioactivities, and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Zhang, Y. H., Shao, Y., Jiao, C., Yang, Q. M., Weng, H. F., & Xiao, A. F. (2020). Characterization and application of an alginate lyase, Aly1281 from marine bacterium *Pseudoalteromonas carrageenovora* ASY5. *Marine drugs*, 18(2), 95.

Zaharudin, N., Salmeán, A. A., & Dragsted, L. O. (2018). Inhibitory effects of edible seaweeds, polyphenolics and alginates on the activities of porcine pancreatic α -amylase. *Food chemistry*, 245, 1196-1203.

Zhao-jing, W., & Dian-hui, L. (2007). Extraction, Purification and Antioxidant Activities of Polysaccharide from *Dioscorea nipponica* Makino. *Natural Product Research & Development*, 19(1).

Zhang, Z., Zhang, Q., Wang, J., Song, H., Zhang, H., & Niu, X. (2010). Regioselective syntheses of sulfated porphyrans from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant and anticoagulant activities in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 79(4), 1124-1129.

WEBOGRAPHIES

- [1]<https://www.futuremarketinsights.com/reports/macroalgae-market>
- [2]<https://www.precedenceresearch.com/alginate-market>
- [3]<https://avinews.com/en/the-role-of-seaweeds-in-poultry-nutrition-ii-strategies-to-improve-them-as-a-feed-ingredient/>
- [4]<https://www.indiancooperative.com/co-op-news-snippets/kribhco-launches-sivarika-a-seaweed-bio-stimulant/>
- [5]https://uel.unisciel.fr/biologie/module1/module1_ch01/co/apprendre_ch1_07.html
- [6]<https://www.reef2reef.com/threads/when-macros-glow-questions-on-red-macroalgae.926561/>
- [7]<https://www.smithers.com/resources/2015/oct/global-market-for-marine-biotechnology>
- [8]<https://docplayer.fr/222805808-Webinar-biomasse-marine-plongez-au-coeur-de-l-innovation-des-marches-18-06-2020.html>
- [9]<https://www.industryarc.com/Research/Global-Agar-Market-Research-509553>
- [10]<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/pectin-market>.
- [11]<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/alginate-market>.
- [12]<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/carrageenan-market>
- [13]<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/alginate-market>
- [14]<https://www.precedenceresearch.com/alginate-market>
- [15]<https://www.researchandmarkets.com/reports/5206559/beta-glucan-and-fucoidan-market-growth>
- [16]<https://straitsresearch.com/report/beta-glucan-and-fucoidan-market>
- [17]<https://www.basf.com/global/en/media/news-releases/2021/08/p-21-280.html>
- [18]<https://superkos.co/new-found-antioxidant-holds-wrinkle-free-skin-secrets/>
- [19]<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/carotenoid-market-158421566.html>
- [20]http://reports.shell.com/sustainabilityreport/2011/servicepages/downloads/files/entire_shell_sr11.pdf
- [21]<https://www.prnewswire.com/news-releases/huge-demand-for-hand-sanitizers-rapidly-increasing-across-the-globe-301059060.html>
- [22]<https://www.statista.com/statistics/1197427/fisheries-and-aquaculture-production-in-tunisia/>

RÉSUMÉ

Le développement de bioprocédés de bioraffinerie à partir de biomasses reste un sujet d'actualité où les bioressources marines ont un rôle majeur à jouer afin d'atteindre l'objectif d'une production durable et efficace d'une grande variété de biomolécules. Ce travail s'adosse au projet PHC MAGHREB « EXPLORE » (19MAG36, 2019-22) visant à identifier des polymères biologiquement actifs à partir de plantes et de macroalgues marines du Maghreb. Les biopolymères extraits de macroalgues présentent ainsi des propriétés techno-fonctionnelles et biologiques originales et spécifiques, qui peuvent être exploitées dans différents domaines. Ce travail s'est donc focalisé sur la purification et la caractérisation de deux polysaccharides matriciels (fucoïdanes et alginates), ainsi que de deux pigments (fucoxanthines et β -carotènes) extraits d'une macroalgue brune collectée de la région de Tabarka (Tunisie) : *Halopteris scoparia*. Les polysaccharides ont été obtenus après des extractions acide et basique. Une extraction et purification de la fucoxanthine et du β -carotène a été réalisée. Les analyses biochimiques ont montré que les fucoïdanes (fraction FHS) étaient riches en oses neutres (64%), en groupements sulfate (7,26%), et composés majoritairement de fucose et de galactose. FHS était caractérisée par une masse molaire de $8,14 \times 10^5$ g/mol. La caractérisation des alginates (fraction AHS) a révélé une teneur élevée en oses acides (53%), avec un ratio ManA/GulA < 1, une masse molaire d'environ $2,52 \times 10^5$ g/mol et de ce fait une capacité à former des gels rigides ($\eta=1,5$). Le comportement rhéologique en solution de AHS a été caractérisé. Une étude par spectroscopie RMN a permis par ailleurs d'identifier la répartition des homo- et hétéro-blocs. Des analyses par chromatographie (CCM, HPLC) ont permis d'identifier et de qualifier leurs pigments extraits. Puis, le « potentiel biologique » des fractions a été évalué. A une concentration de 2 mg/mL, FHS et AHS ont révélé des capacités antioxydantes intéressantes, toutefois relatives en comparaison aux témoins commerciaux. FHS et AHS possédaient également des activités anti-inflammatoires ($CI_{50}=1$ mg/mL) et antidiabétiques (inhibition de l'activité α -amylase et de trypsine avec des CI_{50} 0,1 mg/mL et 0,4 mg/mL) significatives. FHS a confirmé le potentiel des fucoïdanes comme agents anticoagulants, avec des valeurs d'activités obtenues supérieures à celle de l'héparine (à des concentrations de 0,625-10 mg/mL). FHS et ses oligo-fucoïdanes ont montré d'excellentes activités antivirales avec des CE_{50} variant de 19,44 à 27,84 μ g/mL, respectivement, pour une MOI de 0,001 DI_{50} /cellules. Enfin, AHS et ses oligo-alginates ont montré des activités élicitrices contre la fusariose infectant des modèles de plantules de tomates, avec des augmentations des concentrations en polyphénols et de l'activité Phénylalanine ammonia-lyase variables dans les racines et les feuilles. Les fractions de fucoxanthines et de β -carotènes ont présenté des effets antidiabétique ($CI_{50}=300$ et 500 μ g/mL pour l'inhibition de l' α -amylase) et antimicrobien (112,5-225 μ g/mL pour le β -carotène contre *L. monocytogenes*, *S. aureus* ou *S. enterica*). Enfin, la macroalgue et les co-produits générés pendant les procédés d'extraction ont été utilisés comme substrats afin de produire du bio-éthanol, du bio- H_2 et des acides gras volatils *via* plusieurs procédés microbiens. Ces différentes ressources étaient susceptibles d'être converties, sans optimisation des procédés : 0,35 g de bio-éthanol /g MS, 1,3 mL de bio- H_2 /g MS associés à une production d'aides gras volatils de 612 mg de butyrate/ 10 g MS, 225 mg acétate/ 10 g MS, 11 mg de propionate/10 g MS ainsi que 30,5 g de lipides/ 2 g MS. En conclusion, ce travail contribue au développement des approches de bioraffinerie et de valorisation des macroalgues au Maghreb afin de fournir des alternatives socio-économiques et environnementales, éco-raisonnées, aux procédés de synthèses chimiques de molécules actives et/ou d'énergie.

Mots clés : *H. scoparia*, Fucoïdanes, Alginates, Fucoxanthine, β -carotène, Rhéologie, Activités biologiques, Energie.

ABSTRACT

The development of biorefinery bioprocesses from biomass remains a hot topic where marine bioresources have a major role to play in order in achieving the goal of sustainable and efficient production of a wide variety of biomolecules. This work is part of PHC MAGHREB project "EXPLORE" (19MAG36, 2019-22) which aimed to identify biological active polymers from plants and marine macroalgae of Maghreb origin. Thus, extracted biopolymers from macroalgae present original, specific techno-functional and biological properties, which can be exploited in different fields. Therefore, this work focused on the extraction, purification and characterization of two matrix polysaccharides (fucoidans and alginates), as well as two pigments (fucoxanthin and β -carotene) from a brown macroalga collected from Tabarka city (Tunisia) : *Halopteris scoparia*. Both polysaccharides were obtained after acid and base extractions. In parallel, a homogenous extraction and purification of fucoxanthin and β -carotene were carried out. The biochemical analyzes showed that the fucoidans (FHS fraction) were rich in neutral oses (64%) and sulfate groups (7.26%). It was composed mainly of fucose and galactose. FHS was characterized by a molar mass of 8.14×10^5 g/mol. The characterization of the alginates (AHS fraction) revealed a high content of acid monosaccharides (53%), with a ManA/GulA ratio of less than 1, a molar mass of around 2.52×10^5 g/mol and therefore the ability to form a rigid gel ($\eta=1.5$). NMR spectroscopy was also carried out to identify the distribution of homo- and hetero-blocks. Finally, chromatography analyses (CCM, HPLC) were done to identify and characterize purified pigments. Then, the "biological potential" of the fractions was evaluated. At a concentration of 2 mg/mL, FHS and AHS revealed interesting antioxidant capacities, which were relative in comparison to the antioxidant controls. FHS and AHS also showed anti-inflammatory (IC_{50} of approximately 1 mg/mL) and antidiabetic activities (inhibition of α -amylase and trypsin activity with significant IC_{50} which was around 0.1 mg/mL and 0.4 mg/mL). FHS is endowed with an anticoagulant activity higher than that of heparin (at concentrations of 0.625-10 mg/mL). In addition, FHS and its oligo-fucoidans showed excellent antiviral activities with EC_{50} s ranging from 19.44 to 27.84 μ g/mL, respectively, for an MOI of 0.001 ID₅₀/cells. Moreover, AHS and also its oligo-alginates showed eliciting activities against *Fusarium* wilt infecting tomato plant models, via increases in polyphenol concentrations and variation in phenylalanine ammonia-lyase activity in roots and leaves. Otherwise, the fractions enriched in fucoxanthins and β -carotenes showed antidiabetic activities (IC_{50} of the order of 300 and 500 μ g/mL for the inhibition of α -amylase) and antimicrobial potential (antibacterial activity of the order of 112.5-225 μ g/mL for β -carotene) against *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *S. enterica*. For biorefining purposes, the macroalga and their co-products generated during the extraction processes have been used as substrates to produce bioethanol, bio-H₂ and volatile fatty acids via several microbial processes. These different resources were likely to be converted, without process optimization: 0.35 g of bioethanol/g DM, 1.3 mL of bio-H₂/g DM associated with a production of volatile fatty acids (612 mg of butyrate/10g MS, 225 mg acetate/10g MS, 11 mg propionate/10g MS) as well as 30.5 g lipids/2g MS. In conclusion, the present work contributes to the development of biorefinery approaches and the valorization of macroalgae from the Maghreb region to provide socioeconomic and environmental alternatives, eco-reasoned, chemical synthesis processes of active molecules and/or energy.

Keywords : *H. scoparia*, Fucoidan, Alginate, Fucoxanthin, β -carotene, anti-dibetic, anti-bacterial, anti-inflammatory, anti-coagulant, élicitator, Bio-ethanol, bio-hydrogen, bio-diesel, rheology.

Approches de bioraffinage pour la valorisation d'une biomasse macroalgale : Application à l'espèce *Halopteris scoparia*

RÉSUMÉ

Le développement de bioprocédés de bioraffinerie à partir de biomasses reste un sujet d'actualité où les bioressources marines ont un rôle majeur à jouer afin d'atteindre l'objectif d'une production durable et efficiente d'une grande variété de biomolécules. Ce travail s'adosse au projet PHC MAGHREB « EXPLORE » (19MAG36, 2019-22) visant à identifier des polymères biologiquement actifs à partir de plantes et de macroalgues marines du Maghreb. Les biopolymères extraits de macroalgues présentent ainsi des propriétés techno-fonctionnelles et biologiques originales et spécifiques, qui peuvent être exploitées dans différents domaines. Ce travail s'est donc focalisé sur la purification et la caractérisation de deux polysaccharides matriciels (fucoïdanes et alginates), ainsi que de deux pigments (fucoxanthines et β -carotènes) extraits d'une macroalgue brune collectée de la région de Tabarka (Tunisie) : *Halopteris scoparia*. Les polysaccharides ont été obtenus après des extractions acide et basique. Une extraction et purification de la fucoxanthine et du β -carotène a été réalisée. Les analyses biochimiques ont montré que les fucoïdanes (fraction FHS) étaient riches en oses neutres (64%), en groupements sulfate (7,26%), et composés majoritairement de fucose et de galactose. FHS était caractérisée par une masse molaire de $8,14 \times 10^5$ g/mol. La caractérisation des alginates (fraction AHS) a révélé une teneur élevée en oses acides (53%), avec un ratio ManA/GulA < 1, une masse molaire d'environ $2,52 \times 10^5$ g/mol et de ce fait une capacité à former un gel rigide ($\eta=1,5$). Le comportement rhéologique en solution de AHS a été caractérisé. Une étude par spectroscopie RMN a permis par ailleurs d'identifier la répartition des homo- et hétéro-blocs. Des analyses par chromatographie (CCM, HPLC) ont permis d'identifier et de qualifier leurs pigments extraits. Puis, le « potentiel biologique » des fractions a été évalué. A une concentration de 2 mg/mL, FHS et AHS ont révélé des capacités antioxydantes intéressantes, toutefois relatives en comparaison aux témoins commerciaux. FHS et AHS possédaient également des activités anti-inflammatoires ($CI_{50}=1$ mg/mL) et antidiabétiques (inhibition de l'activité α -amylase et de trypsine avec des CI_{50} 0,1 mg/mL et 0,4 mg/mL) significatives. FHS a confirmé le potentiel des fucoïdanes comme agents anticoagulants, avec des valeurs d'activités obtenues supérieures à celle de l'héparine (à des concentrations de 0,625-10 mg/mL). FHS et ses oligo-fucoïdanes ont montré d'excellentes activités antivirales avec des CE_{50} variant de 19,44 à 27,84 μ g/mL, respectivement, pour une MOI de 0,001 DI_{50} /cellules. Enfin, AHS et ses oligo-alginates ont montré des activités élicitrices contre la fusariose infectant des modèles de plantules de tomates, avec des augmentations des concentrations en polyphénols et de l'activité Phénylalanine ammonia-lyase variables dans les racines et les feuilles. Les fractions de fucoxanthines et de β -carotènes ont présenté des effets antidiabétique ($CI_{50}=300$ et 500 μ g/mL pour l'inhibition de l' α -amylase) et antimicrobien (112,5-225 μ g/mL pour le β -carotène contre *L. monocytogenes*, *S. aureus* ou *S. enterica*). Enfin, la macroalgue et les co-produits générés pendant les procédés d'extraction ont été utilisés comme substrats afin de produire du bio-éthanol, du bio- H_2 et des acides gras volatils via plusieurs procédés microbiens. Ces différentes ressources étaient susceptibles d'être converties, sans optimisation des procédés : 0,35 g de bio-éthanol /g MS, 1,3 mL de bio- H_2 /g MS associés à une production d'aides gras volatils de 612 mg de butyrate/ 10 g MS, 225 mg acétate/ 10 g MS, 11 mg de propionate/10 g MS ainsi que 30,5 g de lipides/ 2 g MS. En conclusion, ce travail contribue au développement des approches de bioraffinerie et de valorisation des macroalgues au Maghreb afin de fournir des alternatives socioéconomiques et environnementales, éco-raisonnées, aux procédés de synthèses chimiques de molécules actives et/ou d'énergie.

Mots clés : *H. scoparia*, Fucoïdanes, Alginates, Fucoxanthine, β -carotène, Rhéologie, Activités biologiques, Energie.

Approches de bioraffinage pour la valorisation d'une biomasse macroalgale : Application à l'espèce *Halopteris scoparia*

ABSTRACT

The development of biorefinery bioprocesses from biomass remains a hot topic where marine bioresources have a major role to play in order in achieving the goal of sustainable and efficient production of a wide variety of biomolecules. This work is part of PHC MAGHREB project "EXPLORE" (19MAG36, 2019-22) which aimed to identify biological active polymers from plants and marine macroalgae of Maghreb origin. Thus, extracted biopolymers from macroalgae present original, specific techno-functional and biological properties, which can be exploited in different fields. Therefore, this work focused on the extraction, purification and characterization of two matrix polysaccharides (fucoidans and alginates), as well as two pigments (fucoxanthin and β -carotene) from a brown macroalga collected from Tabarka city (Tunisia) : *Halopteris scoparia*. Both polysaccharides were obtained after acid and base extractions. In parallel, a homogenous extraction and purification of fucoxanthin and β -carotene were carried out. The biochemical analyzes showed that the fucoidans (FHS fraction) were rich in neutral oses (64%) and sulfate groups (7.26%). It was composed mainly of fucose and galactose. FHS was characterized by a molar mass of 8.14×10^5 g/mol. The characterization of the alginates (AHS fraction) revealed a high content of acid monosaccharides (53%), with a ManA/GulA ratio of less than 1, a molar mass of around 2.52×10^5 g/mol and therefore the ability to form a rigid gel ($\eta=1.5$). NMR spectroscopy was also carried out to identify the distribution of homo- and hetero-blocks. Finally, chromatography analyses (CCM, HPLC) were done to identify and characterize purified pigments. Then, the "biological potential" of the fractions was evaluated. At a concentration of 2 mg/mL, FHS and AHS revealed interesting antioxidant capacities, which were relative in comparison to the antioxidant controls. FHS and AHS also showed anti-inflammatory (IC_{50} of approximately 1 mg/mL) and antidiabetic activities (inhibition of α -amylase and trypsin activity with significant IC_{50} which was around 0.1 mg/mL and 0.4 mg/mL). FHS is endowed with an anticoagulant activity higher than that of heparin (at concentrations of 0.625-10 mg/mL). In addition, FHS and its oligo-fucoidans showed excellent antiviral activities with EC_{50} s ranging from 19.44 to 27.84 μ g/mL, respectively, for an MOI of 0.001 ID₅₀/cells. Moreover, AHS and also its oligo-alginates showed eliciting activities against Fusarium wilt infecting tomato plant models, via increases in polyphenol concentrations and variation in phenylalanine ammonia-lyase activity in roots and leaves. Otherwise, the fractions enriched in fucoxanthins and β -carotenes showed antidiabetic activities (IC_{50} of the order of 300 and 500 μ g/mL for the inhibition of α -amylase) and antimicrobial potential (antibacterial activity of the order of 112.5-225 μ g/mL for β -carotene) against *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *S. enterica*. For biorefining purposes, the macroalga and their co-products generated during the extraction processes have been used as substrates to produce bioethanol, bio-H₂ and volatile fatty acids via several microbial processes. These different resources were likely to be converted, without process optimization: 0.35 g of bioethanol/g DM, 1.3 mL of bio-H₂/g DM associated with a production of volatile fatty acids (612 mg of butyrate/10g MS, 225 mg acetate/10g MS, 11 mg propionate/10g MS) as well as 30.5 g lipids/2g MS. In conclusion, the present work contributes to the development of biorefinery approaches and the valorization of macroalgae from the Maghreb region to provide socioeconomic and environmental alternatives, eco-reasoned, chemical synthesis processes of active molecules and/or energy.

Keywords : *H. scoparia*, Fucoidan, Alginate, Fucoxanthin, β -carotene, anti-dibetic, anti-bacterial, anti-inflammatory, anti-coagulant, éliciteur, Bio-ethanol, bio-hydrogen, bio-diesel, rheology.

