Etude de la production de biomolécules d'intérêt (phlorotannins, pigments, lipides) d' algues brunes modèles par des approches combinées de profilage métabolique et d'écophysiologie

Anaëlle Tanniou

▶ **To cite this version:**

Anaëlle Tanniou. Etude de la production de biomolécules d'intérêt (phlorotannins, pigments, lipides) d' algues brunes modèles par des approches combinées de profilage métabolique et d'écophysiologie. Biologie végétale. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2014. Français. NNT : 2014BRES0055 . tel-01928483

HAL Id: tel-01928483
https://theses.hal.science/tel-01928483

Submitted on 20 Nov 2018

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.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
Mention Océanologie Biologique
École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Anaëlle Tanniou

Préparée au laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (UMR 6539)

Etude de la production de biomolécules d'intérêt (phlorotannins, pigments, lipides) d'algues brunes modèles par des approches combinées de profilage métabolique et d'écophysiologie

Thèse soutenue le 28 Janvier 2014
devant le jury composé de :

M. Philippe POTIN, Directeur de Recherche CNRS
Station Biologique de Roscoff / *Rapporteur*

M. Jean-Luc MOUGET, Maître de conférences HDR
Université du Mans / *Rapporteur*

Mme Fabienne GUERARD, Professeur des Universités
Université de Bretagne Occidentale / *Examinateur*

M. Stéphane LA BARRE, Directeur de Recherche CNRS
Station Biologique de Roscoff / *Examinateur*

M. Laurent VANDANJON, Maître de conférences
Université de Bretagne Sud / *Co-Encadrant*

Mme Valérie STIGER-POUVREAU, Maître de conférences HDR
Université de Bretagne Occidentale / Co-*Directrice de thèse (Invitée)*

Mme Nathalie BOURGOUGNON, Professeur des Universités
Université de Bretagne Sud / *Co-Directrice de thèse (Invitée)*

Thèse de Doctorat
Université de Bretagne Occidentale
Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

Présentée par :
Anaëlle Tanniou

En vue de l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Bretagne Occidentale-Spécialité Océanologie Biologique

Etude de la production de biomolécules d'intérêt (phlorotannins, pigments, lipides) d'algues brunes modèles par des approches combinées de profilage métabolique et d'écophysiologie.

Soutenance prévue le 28 Janvier 2014, devant le jury composé des membres suivants :

M. Philippe POTIN, Directeur de Recherche CNRS
Station Biologique de Roscoff / *Rapporteur*

M. Jean-Luc MOUGET, Maître de conférences HDR
Université du Mans / *Rapporteur*

Mme Fabienne GUERARD, Professeur des Universités
Université de Bretagne Occidentale / *Examinateur*

M. Stéphane LA BARRE, Directeur de Recherche CNRS
Station Biologique de Roscoff / *Examinateur*

M. Laurent VANDANJON, Maître de conférences
Université de Bretagne Sud / Co-Encadrant

Mme Valérie STIGER-POUVREAU, Maître de conférences HDR
Université de Bretagne Occidentale / Co-*Directrice de thèse (Invitée)*

Mme Nathalie BOURGOUGNON, Professeur des Universités
Université de Bretagne Sud / *Co-Directrice de thèse (Invitée)*

Remerciements

Avant toute chose, je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour l'octroi de cette bourse de thèse. Je remercie également les directeurs du LEMAR qui se sont succédés : le Dr. Laurent Mémery et le Dr. Olivier Ragueneau, de m'avoir accueillie dans leur laboratoire.

Je tiens à exprimer ma plus grande gratitude aux membres du jury : les rapporteurs Dr. Philippe Potin et Dr. Jean-Luc Mouget et les examinateurs Dr. Stéphane La Barre et Pr. Fabienne Guérard pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail de thèse.

Je n'aurais pas pu effectuer ni mener à bien ce travail de thèse sans le soutien, l'aide et les encouragements de nombreuses personnes que je souhaite vivement remercier ici, et j'espère n'oublier personne :

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs et encadrants. Un immense merci au Dr Valérie Stiger-Pouvreau pour m'avoir fait confiance au long de ces 3 ans (et quelques mois). Merci de m'avoir ouvert les portes du vaste monde des macroalgues et de Sargassum muticum en particulier. Merci pour tout ce que tu m'as fait découvrir et tout ce que tu as su me transmettre. Merci de ton dynamisme, de ta patience, de ta disponibilité et de ton écoute. Merci également au Pr. Nathalie Bourgougnon pour ces conseils avisés lors de la rédaction de ce manuscrit. Un grand merci au Dr. Laurent Vandanjon, formidable co-encadrant, pour ses conseils éclairés et son expertise sur la partie « procédés » de cette étude. Merci de t'être rendu aussi disponible sur ce projet et merci pour ton aide précieuse pour les expériences en IR et en CPC!

Je tiens particulièrement à exprimer ma reconnaissance au Dr Vincent Turpin, qui le premier m'a fait aimer la recherche et la biologie marine en particulier. Comme tu peux le voir, après avoir fait des misères aux microalgues (congélation, décongélation et autres tracas), je me suis assagie. Il faut dire que les macroalgues sont moins dociles !

Merci également à tous les collaborateurs de cette thèse, et en particulier ceux avec qui j'ai eu le privilège de travailler dans le cadre des nombreux projets ayant financés cette étude : merci à Solène Connan et Fabienne Guérard pour m'avoir permis d'effectuer des analyses en HPLC, merci pour votre aide et vos explications. Un grand merci à Jacqueline Le Grand et Jean-Louis Nicolas pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire à Ifremer et pour leur aide lors des mesures des activités antibactériennes. Un très grand merci à Fabienne Le Grand pour avoir pris le temps d'effectuer des analyses des acides gras en GC, merci de ta patience et de ton aide. Merci également à l'équipe de la Station Biologique de Roscoff pour les analyses en spectroscopie de Masse et à la plateforme Biodimar de l'UBO pour les analyses HPLC. Je tiens également à remercier chaleureusement le Pr. Elena Ibanez de l'Université de Madrid pour les analyses qu'elle a effectuées, pour ses

*explications et ses mails toujours pleins de gentillesse. Et enfin merci à tous les partenaires du programme européen BIOTECMAR pour avoir contribué à l'échantillonnage de la Sargasse en Europe : Ashwin Engelen, Vivianne Husa, Monica Incera et Richard Walsh. C'est grâce à vous que cette étude a pu voir le jour ! Enfin, merci également au futur docteur Kevin Hardouin pour les analyses en hydrolyse enzymatique qu'il a effectuées au laboratoire LBCM à Vannes sur notre Sargasse favorite. Bon courage c'est bientôt ton tour !^^*

Merci à l'équipe du GEPEA, St-Nazaire pour m'avoir accueillie à nouveau pour effectuer quelques analyses : un grand merci au Dr. Olivier Gonçalves et au Dr. Luc Marchal pour leur aide et leurs explications.

Tous mes remerciements à Stéphane Cérantola et son équipe pour m'avoir ouvert les portes du service RMN-RPE de l'UBO. Merci à Nelly Kervarec, à Gaëlle Simon, sans qui une bonne partie de ce travail n'aurait pas été possible. Nelly, merci pour ta patience, ta générosité et surtout ta bonne humeur !!

Un grand merci à toute l'équipe du « LEBHAM ». Merci à Marie-Aude Poullaouec et Isabelle Bihannic qui ont toujours été là pour répondre aux petites tracasseries du quotidien, pour les pauses café, le chocolat et les gâteaux (merci Isa !) et qui n'étaient pas les dernières pour partir dans des fou-rires (plus ou moins) contrôlés. Merci à toi Marie-Aude pour ton aide précieuse à la paillasse.

Je remercie aussi les enseignants-chercheurs de l'UBO, notamment le Dr. Erwan Ar Gall et le Dr. François Lambert grâce à eux et à Valérie, j'ai pu enseigner quelques cours pendant deux ans. Je salue aussi le Dr. Michel Le Duff, le Dr Nathalie Poupart et les deux nouveaux habitants du couloir « LEBHAM »: Dr. Edouard Kraffe et le Dr. Gauthier Schaal.

Merci à tous ceux qui sont passés par le bureau A030, doctorants et stagiaires et qui ont contribué aux délires et aux moments de franches rigolades : Camille Jégou, Erell Le Deun, Esteban Serrano León et Elise Charpentier. Merci également à ceux qui n'y ont pas séjourné mais qui sont venus y apporter un peu de joie : nous les appellerons les compagnons des journées du goût (Lisa, Marianna et Garlonne,) et enfin : Thomas, Carole, Sophie, Yaëlle, Chloé, Florian et Alexandre.
Enfin, merci au Dr. Klervi Le Lann, de retour sur Brest, qui a su m'épauler pour de nombreux travaux, répondre à mes questions, merci pour tes conseils, ta bonne humeur et ton calme.

Merci aux stagiaires qui ont travaillé à ce projet et qui m'ont été d'une aide précieuse. Merci donc à Léo Vic, Claudia Zea et Carole Hersant. J'ai

particulièrement aimé travailler avec vous. Bon courage à vous trois pour vos projets!

Bon courage enfin aux futurs docteurs Gwladys Le Diouron, tu as toutes les qualités pour mener à bien ta thèse alors bonne continuation !

Je vais déposer ici des remerciements un peu particuliers pour tous ceux qui ont été là « à côté » :

Un merci tout particulier pour Esteban Serrano León, stagiaire « free lance » et grand ami. Merci pour ta disponibilité et pour tous ces moments d'amitié partagés ; merci d'avoir su m'écouter et me soutenir dans les moments de doutes. Merci pour ta bonne humeur constante, les balades et les petits cours d'espagnol. Hasta pronto !

Et pour Monsieur le Dr. Jégou: ça y est ! Je te remercie pour ton aide précieuse à mes débuts, pour tous tes conseils (ça m'a évité quelques catastrophes). Toi qui es maintenant docteur, alors la sérénité est-elle au rendez-vous ? Je l'espère en tout cas.

Un grand merci également à Thomas Guérin, pour les pauses café, les retours sur Nantes en musique (^^) et les casse-croûtes! J'espère de tout cœur que tes projets aboutiront !

Je remercie également tous mes amis qui ont su être présents, d'une façon ou d'une autre, durant toute cette aventure (Virginie et Laurent en particulier, merci d'avoir su comprendre mes absences ces derniers temps), merci de m'avoir ramené des souvenirs de vos voyages, même attachée à ma chaise de bureau je m'évadais un peu ;). Je remercie également Fabien (le nantais) et Fabien (le soissonnais), Keal, Mapou, Thomas et Erell pour leurs petits mots de soutien dans la dernière ligne droite, ses petits encouragements m'ont été d'un GRAND secours et m'ont aidé à tenir le cap !

Merci également et surtout à toute ma famille. Merci à vous qui avez cru en moi, qui m'avez encouragée et soutenue depuis le début pour que j'arrive à l'aboutissement de cette grande aventure qu'est la thèse. Merci pour votre aide et votre patience. Merci à mon frère, Erwan, pour son soutien dans les moments difficiles et pour son aide précieuse lors de l'élaboration du système de simulation des marées en milieu contrôlé.

Et enfin merci à toi Cédric pour avoir su, cette dernière année, partager avec moi ton goût des balades en moto, merci de m'avoir encouragée, soutenue et remotivée surtout durant la période de rédaction. Merci de tout cœur !

SOMMAIRE

Introduction générale **11**

Chapitre I- Présentation générale **21**

I.1. Introduction 23

I.2. Présentation des modèles biologiques 23

I.2.1. Position taxonomique et richesse spécifique de la classe des Phéophycées 23

I.2.2. Description des espèces étudiées 25

I.2.2.1. *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis 25

I.2.2.2. *Pylaiella littoralis* (Linnaeus) Kjellman 26

I.2.2.3. *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt 30

I.3. Description des sites d'étude 35

1.3.1. Généralités sur la colonne d'eau 35

I.3.2. Description des sites étudiés en France 37

I.3.2.1. Caractéristiques des côtes bretonnes 37

I.3.2.2. Description des sites étudiés en Bretagne 39

I.3.3. Description de la côte atlantique et des pays étudiés en termes de couverture végétale et de climat 45

I.3.4. Description des sites étudiés en Europe Atlantique 48

I.3.4.1. Sites échantillonnés en Norvège 48

I.3.4.2. Sites échantillonnés en Irlande 49

I.3.4.3. Sites échantillonnés en Espagne 50

I.3.4.4. Sites échantillonnés au Portugal 51

I.4. Variabilité des paramètres du milieu et incidence sur les teneurs en biomolécules 53

I.4.1. Descriptions des paramètres du milieu 53

I.4.1.1. Température 53

I.4.1.2. Hydrodynamisme 54

I.4.1.3. Luminosité 55

I.4.1.4. Salinité 56

I.4.1.5. Nutriments 57

I.4.2. Mesure des paramètres environnementaux 58

I.5. Les différents compartiments biochimiques étudiés 61

I.5.1. Macromolécules 61
I.5.1.1. Protéines 62
I.5.1.2. Glucides 63
I.5.1.3. Lipides 64
I.5.2. Pigments 67
I.5.3. Composés phénoliques 69
I.5.3.1. Structure des phlorotannins : 70
I.5.3.2. Teneur chez les macroalgues brunes 72
I.5.3.3. Rôles des composés phénoliques chez les macroalgues brunes 74
I.5.3.4. Activités et utilisation des composés phénoliques 75
I.6. Protocoles de dosage et d'analyse classiquement utilisés pour l'analyse des extraits phénoliques 76
I.6.1. Extraction et dosage des composés phénoliques 76
I.6.1.1. Extraction des composés de type polyphénoliques 76
I.6.1.2. Mesure de la teneur en composés phénoliques 76
I.6.2. Obtention d'empreinte chimique par résonance magnétique nucléaire 77
I.6.2.1. RMN-HRMAS ou RMN in vivo. 77
I.6.2.2. RMN des solutions 77
I.6.3. Dosage des activités biologiques : 81
I.6.3.1.Dosage de l'activité antiradicalaire par spectrophotométrie. 81
I.6.3.2. Détermination de l'activité antioxydante par la méthode des β-carotène sur microplaque 82

Chapitre II- Extraction des composés phénoliques par procédés éco-respectueux 85

II.1. Introduction 87
II.2. Extraction Solide-Liquide classique 88
II.2.1. Généralités 88
II.2.1.1. Définitions 89
II.2.1.2. Facteurs intervenant dans l'extraction 90
II.2.1.3. Cas des algues et extraction de composés phénoliques 92

II.2.2. Matériels et méthodes 95

II.2.2.1. Effet de la nature du solide sur l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques chez trois espèces d'algues brunes 95

II.2.2.2. Etude des conditions d'extraction solide/liquide 97

II.2.3. Résultats 98

II.2.3.1. Effet de la nature du solide 98

II.2.3.2. Etude des conditions d'extraction solide/liquide 103

II.2.4. Discussion 130

II.2.4.1.Effet de la nature du solide 130

II.2.4.2. Influence des conditions opératoires sur l'efficacité de l'extraction solide/liquide classique 132

II.2.4.3. Conclusion sur l'extraction Solide-liquide 133

II.3. Procédés alternatifs utilisés pour l'extraction des phlorotannins 134

II.3.1. Généralités 134

II.3.1.1. Extraction de Partage Centrifuge (EPC) 134

II.3.1.2. Extraction par fluide pressurisé et fluide supercritique 137

II.3.1.3. Utilisation des procédés pour l'extraction de composés phénoliques 144

II.3.2. Matériels et Méthodes 145

II.3.2.1. Extraction de Partage Centrifuge (EPC) 145

II.3.2.2. Extraction par fluide pressurisé et fluide supercritique 149

II.3.3. Résultats 151

II.3.3.1. Extraction de Partage Centrifuge (EPC) 151

II.3.3.2. Extraction par fluide pressurisé et fluide supercritique 153

II.3.3.3. Comparaison des procédés innovants (SFE, PLE, EPC) avec l'extraction S/L classique .. 156

II.3.4. Discussion 166

II.3.4.1. Extraction de Partage Centrifuge (EPC) 166

II.3.4.2. Extraction par fluide pressurisé et fluide supercritique 167

II.3.4.3. Comparaison des procédés innovants (SFE, PLE, EPC) avec l'extraction S/L classique .. 167

II.3.5. Conclusion 171

II.4. Travail préparatoire à l'extraction 171
II.4.1.Généralités 172
II.4.1.1. Définition de l'extrusion 172
II.4.1.2. Spécificités de l'extrudeur bi-vis et utilisation pour l'extrusion réactive 173
II.4.1.3. Applications de l'extrusion réactive 174
II.4.2. Matériels et méthodes 175
II.4.2.1. Extrusion seule 175
II.4.2.2. Extrusion réactive 177
II.4.3. Résultats 178
II.4.3.1. Extrusion seule 178
II.4.3.2. Extrusion réactive 181
II.4.4. Discussion 182
II.4.5.Conclusion 183
II.5. Conclusion sur les procédés d'amélioration de l'extraction des composés phénoliques 183

Chapitre III- Etude de la variabilité chimique de *Sargassum muticum* en Europe 187

III.1. Introduction 189
III.2. Comparaison de deux techniques pour la discrimination des échantillons de S.muticum d'après leur provenance géographique: IR/RMN HR-MAS 190
III.2.1.Introduction 190
III.2.1.1. But de l'étude 190
III.2.1.2. Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourrier (IRTF) 191
III.2.1.3. Résonance Magnétique Nucléaire HR-MAS 193
III.2.2. Matériels et méthodes 193
III.2.2.1. Echantillonnage et préparation des échantillons 193
III.2.2.2. Analyses en spectroscopie RMN HR-MAS 194
III.2.2.3. Analyses en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) 194
III.2.3.Résultats et discussion 195
III.2.4. Conclusion 203

III.3. Suivi de populations naturelles de Sargassum muticum le long d'un gradient latitudinal Portugal-Norvège 206

III.3.1.Introduction 206

III.3.2. Matériels et méthodes 206

III.3.2.1. Echantillonnage et mesure des thalles 206

III.3.2.2. Concentration en glucides totaux 207

III.3.2.3. Concentration en protéines totales 207

III.3.2.4. Composition en pigments 209

III.3.2.5. Composition en acides gras 211

III.3.2.6. Analyse statistiques des données 211

III.3.3.Résultats 212

III.3.3.1. Taille des individus échantillonnés 212

III.3.3.2. Variabilité des glucides et protéines totaux, de la composition en acides gras et en pigments de Sargassum muticum le long du gradient latitudinal 214

III.3.3.3. Evolution des teneurs en macromolécules par rapport aux paramètres environnementaux 236

III.3.4.Discussion 240

III.3.4.1. Taille des individus de *Sargassum muticum* en fonction des paramètres du milieu 240

III.3.4.2. Effet des paramètres environnementaux sur les compartiments macromoléculaires. 241

III.3.4.3. Comparaison des résultats obtenus avec les tendances visibles en IR/RMN HR-MAS. 245

III.3.5.Conclusion 247

Chapitre IV- Variabilité et semi-purification des composés phénoliques de *Sargassum muticum* en Europe 249

IV.1. Introduction 251

IV.2. Variabilité des teneurs en composés phénoliques en France 252

IV.2.1. Introduction 252

IV.2.2. Matériels et méthodes 252

IV.2.2.1. Echantillonnage 252

IV.2.2.2. Obtention d'empreinte chimique par résonance magnétique nucléaire HR-MAS ou *in vivo* 254

IV.2.2.3. Extraction de composés aromatiques 254

IV.2.2.4. Mesure de la teneur en composés phénoliques 255

IV.2.2.5. Dosage des activités biologiques 255

IV.2.2.6. Analyse statistique des données 255

IV.2.3. Résultats 255

IV.2.3.1. Etude de la variabilité saisonnière 255

IV.2.3.2. Variabilité spatiale de la teneur en composés phénoliques chez *S.muticum* suivant le site d'étude en Bretagne 257

IV.2.3.3. Teneur en composés phénoliques dans l'eau de récolte : composés exsudés en fonction des sites d'échantillonnage 259

IV.2.3.4. Variabilité inter individuelle : effet de l'âge et de la partie du thalle chez *Sargassum muticum* 260

IV.2.4. Discussion 263

IV.2.4.1. Etude de la variabilité saisonnière 263

IV.2.4.2. Variabilité spatiale de la teneur en composés phénoliques chez *S.muticum* sur la pointe bretonne suivant le site d'étude 264

IV.2.4.3. Teneur en composés phénolique dans l'eau de récolte : composés exsudés en fonction des sites d'échantillonnage 265

IV.2.4.4. Variabilité inter individuelle : effet du stade de développement, de l'âge et de la partie du thalle 265

IV.2.5. Conclusion 268

IV.3. Séparation et semi-purification des composés phénoliques 268

IV.3.1.Introduction 268

IV.3.2.Matériels et méthodes 271

IV.3.2.1. Echantillonnage 271

IV.3.2.2. Extraction des composés phénoliques 271

IV.3.2.3. Semi-purification des phlorotannins 271

IV.3.2.4. Purification sur colonne SPE (Solid Phase Extraction) 271

IV.3.2.5. Purification selon un procédé liquide-liquide 272

IV.3.2.6. Séparation des composés phénoliques par classes de taille et comparaison de différentes techniques de séparation 274

IV.3.2.7. Comparaison de méthodes de séparation par taille 278

IV.3.2.8. Tests d'appréciation de l'activité biologique 278

IV.3.3.Résultats 282

IV.3.3.1. Variabilité de la teneur en CP chez *Sargassum muticum* prélevée le long du gradient latitudinal 282

IV.3.3.2. Complément d'informations sur les résultats de purification par SPE des extraits de *Sargassum muticum* le long du gradient latitudinal 299

IV.3.3.3. Séparation des phlorotannins 303

IV.3.4.Discussion 315

IV.3.4.1. Variabilité des teneurs et activités des composés phénoliques dans les extraits bruts de *Sargassum muticum* en Europe 315

IV.3.4.2. Purification SPE des extraits bruts obtenus 317

IV.3.4.3. Relation entre paramètres environnementaux et teneur en composés phénoliques en Europe 318

IV.3.4.4. Purification Liquide-liquide des extraits (avant leur séparation ultérieure par la taille) 320

IV.3.4.5. Séparation par la taille des composés phénoliques semi-purifiés 320

IV.3.4.6. Détermination du type de structure des phlorotannins produits par *Sargassum muticum* en Europe 324

IV.3.5.Conclusion 325

IV.4. Expérimentations en milieu contrôlé 327

IV.4.1.Introduction 327

IV.4.2. Matériels et méthodes 328

IV.4.2.1. Matériel biologique 328

IV.4.2.2. Système utilisé pour le maintien de biomasse algale au laboratoire 328

IV.4.2.3. Effet des UV-A/UV-B sur la production de CP par les algues 330

IV.4.2.4. Effet de la température de l'eau sur la production de CP 331

IV.4.2.5. Mesures effectuées sur les échantillons prélevés 332

IV.4.2.6. Mise au point d'un système électronique de simulation des marées 333

IV.4.3. Résultats 333

IV.4.3.1. Impact des UV-A et UV-B 333

IV.4.3.2. Impact de la température 339

IV.4.3.3. Résumé des résultats obtenus pour les deux conditions testées 340

IV.4.4. Discussion 340

IV.4.4.1. Effet de l'intensité lumineuse sur la quantité de composés phénoliques produits par *S.muticum* en conditions contrôlées 340

IV.4.4.2. Effet de la température de l'eau sur la quantité de composés phénoliques produits par *S.muticum* en conditions contrôlées 341

IV.4.4.3. Limitations et solutions envisagées 342

IV.4.5. Conclusion 344

Conclusion générale **345**

Références bibliographiques **355**

Annexes **389**

Introduction générale

Valorisation des macroalgues dans le secteur industriel

La valorisation des macroalgues est réalisée depuis l'antiquité, notamment à travers leur exploitation dans l'alimentation humaine et animale. Ces pratiques remontent au quatrième siècle au Japon et au sixième siècle en Chine (McHugh, 2003). De nos jours ces algues sont utilisées principalement dans trois secteurs : celui de l'agroalimentaire, de l'industrie des texturants et enfin dans l'alimentation animale et pour les industries pharmaceutique et cosmétique.

L'alimentation humaine est le premier secteur consommateur de macrolagues dans le monde. Ces algues sont en effet réputées pour leur richesse en fibres (Jiménez-Escrig et Sanschez-Muniz, 2000). L'utilisation culinaire des algues est particulièrement développée en Chine et en république de Corée. La Chine est le plus grand producteur mondial d'algues comestibles avec une production d'environ 10 millions de tonnes d'algues fraîches/an. La majeure partie de cette production est représentée par l'algue brune *Saccharina japonica* (Areschoug) (connue auparavant sous le nom de *Laminaria japonica* J.E. Areschoug) utilisée pour la fabrication du kombu[1]. La république de Corée produit quant à elle, environ 800 000 tonnes d'algues fraîches par an. Près de 50% de cette production est représentée par la culture de l'algue brune *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, utilisée pour la fabrication du wakamé[1]. La production japonaise est quant à elle évaluée à 600 000 tonnes d'algues fraîches dont 75% servent à la préparation du nori[1] (entrant dans l'élaboration des sushis) à partir d'espèces du genre *Porphyra* C. Agardh (algue rouge). Ces produits alimentaires représentent un marché important et ont des valeurs importantes en particulier le nori, très couteux (16 000 US$/tonne de poids sec), comparé au kombu (2 800 US$/tonne de matière sèche) ou au wakamé (6 900 US$ /tonne de matière sèche) (McHugh, 2003). Cependant, les algues alimentaires sont également bioaccumulatrices de pesticides ou de métaux lourds tels que le cadmium et surtout l'arsenic. Leur récolte doit donc être scrupuleusement contrôlée (définition de teneurs maximales en polluants autorisées) afin d'éviter des risques pour la santé humaine.

La deuxième utilisation mondiale des macroalgues est le marché des texturants : certaines algues sont utilisées pour la production de phycocolloïdes employés, principalement, comme additifs alimentaires. Les algues rouges contiennent deux types d'hydrocolloïdes : l'agar et les carraghénanes. Les algues brunes produisent des phycocolloïdes acides : les alginates. Ces trois types de carbohydrates hydrosolubles utilisés pour augmenter la viscosité des solutions aqueuses, forment ainsi des gels ou des films, et servent d'agents texturants dans divers produits, tels que les crèmes glacées, les flans ou les dentifrices. L'utilisation des algues comme source d'hydrocolloïdes remonte à 1658 au Japon quand furent découvertes les propriétés gélifiantes de l'agar extrait à l'eau chaude à partir d'une algue rouge. Au dix-huitième siècle, des extraits de l'algue rouge *Chondrus crispus* Stackhouse, contenant des carraghénanes, furent utilisés comme agent épaississant. Enfin, il faut attendre les années 1930 pour que les alginates soient produits et commercialisés comme agent gélifiant et épaississant. L'exploitation industrielle d'extraits d'algues s'est ensuite intensifiée après la

[1] Ingrédient utilisé en cuisine asiatique : japonaise et/ou coréenne

seconde guerre mondiale, limitée toutefois par la disponibilité en matière première. Pour faire face à cette demande d'hydrocolloïdes, la culture des algues s'est développée. Ainsi, dans le monde, environ 1 million de tonnes d'algues fraîches sont récoltées. La production totale annuelle d'hydrocolloïdes s'élève à environ 55 000 tonnes, représentant une valeur de l'ordre de 585 millions US$ (McHugh, 2003). En Bretagne, la production d'alginates (213 millions US$/an) est réalisée à partir de la récolte d'algues brunes sauvages telles *Laminaria digitata* (Hudson) J.V. Lamouroux ; la culture de celles-ci s'avérant trop coûteuse pour servir de source de matière première. Les produits cosmétiques utilisent parfois des produits à base d'algues sous des appellations telles que «extrait marin», « actif marin » ou «extrait d'algue». Dans la plupart des cas cela signifie qu'un hydrocolloïde d'origine algale a été ajouté à la préparation. Les alginates et carraghénanes issus de macroalgues ont par exemple des propriétés hydratantes et augmentent la capacité de la peau à retenir l'eau.

Arrive en troisième lieu des utilisations plus hétéroclites telles que l'alimentation animale, l'élaboration de fertilisants agricoles, le traitement des eaux, et enfin, la recherche de molécules actives pour l'industrie de la cosmétologie, de la pharmacie ou du médical.

Une des plus anciennes applications de ces algues est en effet, leur utilisation dans l'alimentation animale. Depuis, elles sont toujours utilisées en tant que complément alimentaire pour le bétail. La Norvège est le premier pays à avoir développé cette industrie dans les années 1960. Environ 50 000 tonnes d'algues fraîches/an sont ainsi récoltées, aboutissant à la production de 10 000 tonnes de complément alimentaire, représentant une valeur marchande d'environ 5 millions $US (McHugh, 2003).

Un autre usage empirique des macroalgues est leur utilisation en tant que fertilisant. Le contenu important en fibres des algues conditionne le sol et permet de retenir l'humidité, tandis que les minéraux et en particulier les sels de sodium et de potassium qu'elles contiennent, agissent comme fertilisant et source d'éléments traces. Ce sont, en particulier, des extraits apolaires lipidiques qui sont utilisés à ces fins. Ceux-ci sont produits sous forme de solution concentrée que l'utilisateur dilue avant emploi. En 1991, on estimait à environ 10 000 tonnes d'algues fraîches utilisées pour obtenir 1 000 tonnes d'extraits pour une valeur marchande avoisinant les 5 millions $US. Le développement de l'agriculture biologique en Europe, lors de la dernière décennie, a permis de valoriser davantage ces fertilisants au fort pouvoir éliciteur puisqu'ils favorisent la croissance des plantes et constituent une protection efficace contre certaines pathologies.

Une autre utilisation de ces algues concerne le traitement des eaux usées. Ainsi, certaines algues sont capables d'absorber les métaux lourds présents dans les eaux polluées. L'aquaculture intégrée illustre bien cette propriété qu'ont les algues à utiliser les déchets de l'aquaculture comme source de nutriments. Les eaux provenant des exploitations piscicoles contiennent des taux de polluants élevés pouvant poser des problèmes à la vie aquatique adjacente. Pour éviter cette pollution, des essais ont été menés visant à établir des cultures d'algues adjacentes aux exploitations piscicoles pour épurer les eaux d'élevages.

L'utilisation la moins développée, mais sans doute la plus prometteuse, est la recherche, à partir de ces algues, de biomolécules à activités biologiques notoires. Les macroalgues marines vivent dans un environnement marin complexe. Face aux stress biotiques (les brouteurs, le fouling, la prédation de manière générale) ou abiotiques (la

compétition pour l'espace, les radiations UV, les variations de salinité ou de température) (Amsler, 2012), elles ont développé des stratégies adaptatives. Les molécules synthétisées par les algues en réponse à ces facteurs sont souvent originales et connues pour avoir des propriétés physiologiques et biologiques intéressantes (Kornprobst, 2010; Hu *et al*., 2012). Depuis 1960, de nombreux travaux traitant des activités biologiques chez les macroalgues ont été effectués, avec une augmentation croissante du nombre d'études sur le sujet. Les métabolites issus de macroalgues marines montrent un large panel d'activités biologiques comme des propriétés anti-cancéreuses, anti-microbiennes, anti-inflammatoires, anti-virales, anti-coagulantes, anti-diabétiques et anti-oxydantes (Shin *et al*., 2006 ; Cumashi *et al*., 2007 ; Ioannou et Roussis, 2009; Sithranga Boopathy et Kathiresan, 2010; Tierney *et al*., 2010; Mayer *et al*., 2011; Gupta et Abu-Ghannam, 2011a; Chu, 2011). Ces composés bioactifs appartiennent à différentes classes de composés chimiques tels que les polysaccharides (Wijesinghe et Jeon, 2012a), les polyphénols (Li *et al*., 2011), les composés terpéniques (Blunt *et al*., 2013), les peptides (Harnedy et FitzGerald, 2011), les caroténoïdes (Li et Kim, 2011) et les acides gras (Miyashita *et al*., 2011). Ces composés sont mis au service de divers domaines tels que l'industrie cosmétique, pharmaceutique et médicale. Les produits naturels décrits chez les macroalgues représentent 10% des 20 000 composés isolés à partir d'organismes marins (Ioannou et Roussis, 2009; Blunt *et al*., 2013; Pereira et Costa-Lotufo, 2012) et les propriétés biologiques des macroalgues sont résumées dans de nombreuses revues (Parapurath *et al*., 2011; Hu *et al*., 2012). Certains genres appartenant aux principales classes de macroalgues (Phéophycées, Floridéo- et Bangiophycées ainsi qu'Ulvophycées) sont étudiés de nos jours comme source potentielle de composés biologiques actifs et sont présentés sur la Figure 1. Ainsi, les algues rouges et brunes apparaissent comme de précieuses sources de composés pouvant intéresser l'industrie (Stengel *et al*., 2011). Le nombre d'articles concernant les recherches effectuées sur les composés actifs identifiés chez les macroalgues augmentent d'année en année alors que paradoxalement, le nombre de composés identifiés, lui, diminue depuis les années 2000 (Ioannou et Roussis, 2009). Il faut préciser que l'identification de ces molécules est rendue difficile par la grande variabilité de structures et d'activités différentes pour ces composés qui oblige à adapter constamment les techniques et les tests biologiques permettant d'évaluer leurs activités. Par ailleurs les nombreuses normes et processus légaux précédant la mise sur le marché des produits constituent un obstacle rendant difficile l'utilisation de ces molécules naturelles par les laboratoires pharmaceutiques dans le cadre d'une élaboration de nouveaux médicaments par exemple. Ces substances actives sont très peu utilisées ; seuls quelques composés rentrent dans la composition de certains médicaments ou produits industriels. Certaines substances sont déjà utilisées dans l'industrie médicale et pharmaceutique comme par exemple certains furanones halogénés utilisés dans la défense antifouling, certains polysaccharides sulfatés utilisés pour leur action antivirale. D'autres molécules auraient même des applications dans le traitement de certaines tumeurs et du virus VIH comme par exemple le kahalalide F provenant d'une espèce de *Bryopsis* ; elle serait par ailleurs, à notre connaissance, la seule molécule extraite à partir d'algue ayant franchi les étapes de test clinique permettant le développement de médicament pour la santé humaine (Bhatnagar et Kim, 2010). Parmi les activités biologiques les plus recherchées par les scientifiques, les composés cytotoxiques arrivent en tête, suivis des

composés antibiotiques et antifongiques, puis des composés anti-inflammatoires et antifouling et enfin des composés anti-VIH et antioxydants (Ioannou et Roussis, 2009).

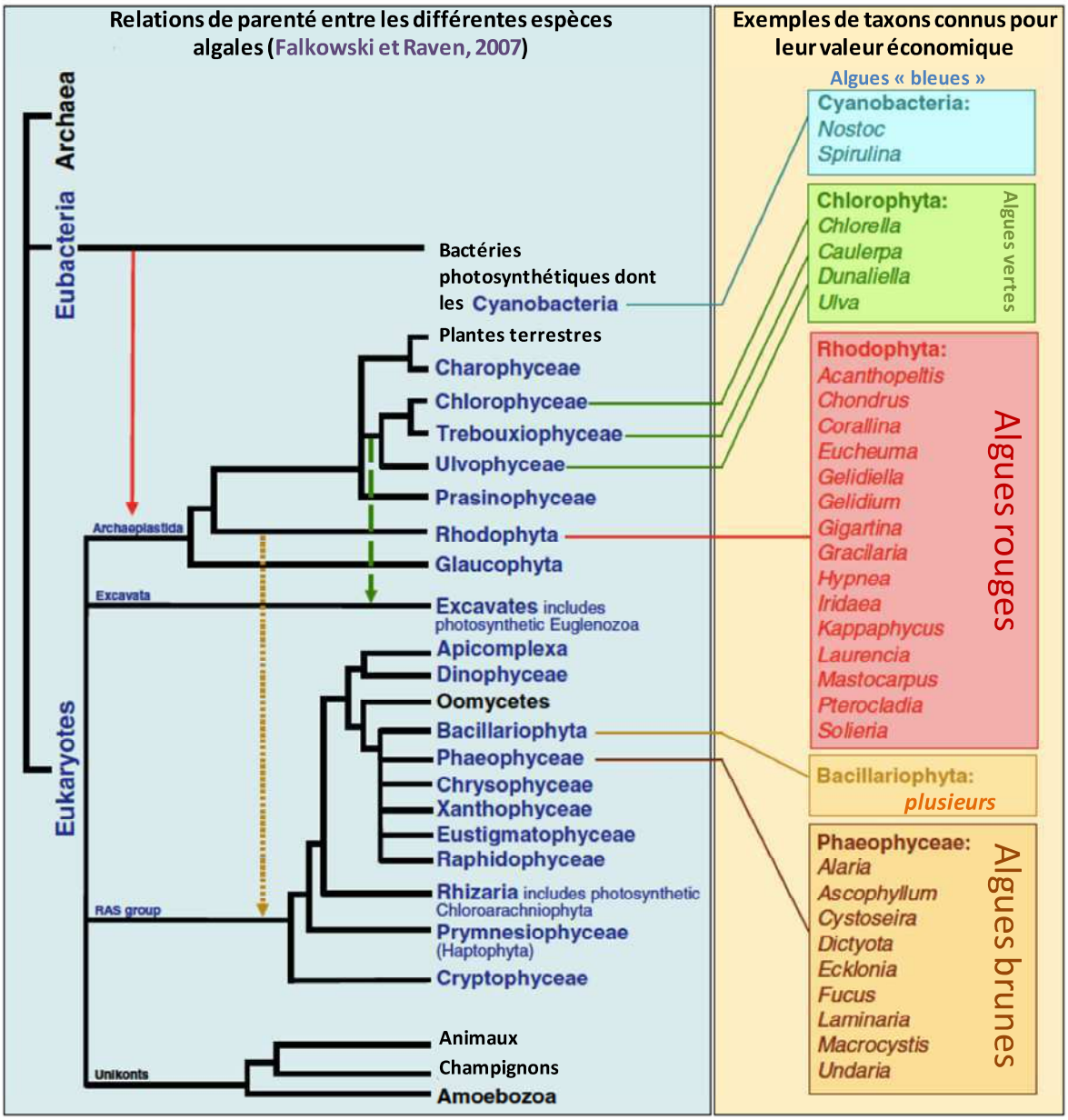


Figure 1. Relations de parenté entre les trois domaines majeurs de la vie : Archées, Eubactéries et Eucaryotes (partie gauche). Les classes contenant des genres considérés comme des algues sont mises en évidence en bleu et certains genres d'algue d'importance économique significative sont listés dans la partie droite. D'après Stengel *et al.* (2011).

Ces dernières années, les substances naturelles connaissent un intérêt grandissant dans de nombreux domaines. En effet, les consommateurs sont de plus en plus réticents à consommer des produits contenant des molécules issues de la synthèse chimique. De nombreux secteurs industriels (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire) se tournent à nouveau vers l'incorporation dans leurs produits de molécules d'origine naturelle, aux caractéristiques chimiques et biologiques originales. La valorisation de ces principes actifs d'origine naturelle représente donc un énorme potentiel économique. Pour être valorisés, les composés bioactifs doivent d'abord être séparés de leur matrice algale d'origine. L'obtention

de ces molécules nécessite de nombreuses étapes souvent longues et coûteuses, telles que l'extraction, l'isolement par des procédés de purification ou de semi-purification (suivant le degré de pureté recherché) et l'identification. Tout ces processus freinent encore davantage leur production industrielle. Un des enjeux majeurs de la chimie analytique consiste donc en l'innovation technologique et le développement de nouvelles méthodologies d'extraction, de séparation rapide, de miniaturisation, de couplage… tout en répondant aux nouvelles normes Européennes s'inscrivant dans une démarche de « chimie verte » et de respect de l'environnement.

Contexte, objectifs de cette étude et plan du manuscrit

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été dans un premier temps de participer à ces avancées technologiques en mettant en œuvre, sur des modèles algaux, des méthodes innovantes d'extraction, de fractionnement et d'identification des composés naturels extraits. Ces avancées technologiques nous ont permis d'obtenir une fraction active de façon rapide et efficace, sans trop dénaturer les autres constituants (afin de permettre leur valorisation ultérieure), tout en réduisant les quantités de solvant, d'énergie et d'échantillon consommés. Ce travail pose également les bases qui permettront d'adapter le concept de bioraffinage aux algues ; c'est-à-dire de valoriser la totalité des constituants des algues. L'intégralité des développements méthodologiques effectués au cours de cette thèse a été réalisée à partir de macroalgues brunes et en particulier d'une espèce invasive *Sargassum muticum*, qui, par sa richesse phytochimique, s'avère être une algue « modèle » appropriée à la mise en œuvre de nombreuses méthodes d'analyse. Sur un autre plan, la récupération de métabolites bioactifs constitue une manière de valoriser une algue invasive dont la prolifération n'a pas pu jusqu'alors être maîtrisée.

Ce travail de recherche, réalisé au sein du LEMAR (**L**aboratoire des sciences de l'**E**nvironnement **MAR**in) de l'**I**nstitut **U**niversitaire **E**uropéen de la **M**er (IUEM, Plouzané, France), s'inscrit dans deux des thématiques de l'équipe portant sur 1) l'écologie chimique des végétaux marins (Axe de recherche n°3) et sur 2) la gestion durable de ressources marines ciblées : les espèces invasives (Axe de recherche 3.5) ; ces deux points couvrant à la fois les aspects écologiques et chimiques de cette **étude pluridisciplinaire**.

Ainsi, une partie de la thèse a été financé par trois projets de recherche (projet interreg IVB BIOTECMAR, projet Era-net/Seas-era INVASIVES et projet UEB INVADIV, *cf.* encadré ci-contre) dont un des objectifs ultime étaient de comprendre comment les algues se défendent face à leur environnement et comment varient leur contenu biochimique en réponse aux paramètres du milieu. Grâce au projet européen Biotecmar, notre étude a pu se faire à grande échelle par la récolte de l'espèce *Sargassum muticum* dans cinq pays le long d'un gradient Atlantique Nord-Sud (de la Norvège au Portugal). L'autre partie de la thèse, également soutenue par plusieurs projets (Projet intégrateur GIS Europôle Mer PHLOROTAN-ING et projet COSELMAR, *cf.* encadré ci-contre), s'est basée davantage sur les procédés chimiques d'extraction et de purification des molécules dans le but de trouver des voies de valorisation pour certains composés d'intérêts produits par ces espèces et notamment les composés phénoliques.

LES PROJETS :

Le projet **Phlorotan-ING (2009-2012)** est un projet intégrateur du Groupement d'Intérêt Scientifique Europôle Mer (GIS-Europole Mer), qui réunit l'Université de Bretagne Occidentale et la Station Biologique de Roscoff autour de molécules d'intérêt à valoriser. Son but est de comprendre les voies de synthèse des phlorotannins des algues brunes, en combinant des approches de chimie, de biochimie et d'écologie à une démarche de génomique fonctionnelle. Au démarrage, le projet s'appuyait sur trois espèces-modèles : *Ectocarpus siliculosus*, *Ascophyllum nodosum* et *Sargassum muticum*. Phlorotann-ING a notamment financé la mise au point du protocole de purification des phlorotannins et les analyses associées (identification structurale, activités biologiques) ainsi que la participation au Congrès Alg'n'Chem qui s'est déroulé à Montpellier en novembre 2012. Ce projet a financé les manipulations et analyses lors des stages Erasmus Mundus d'Esteban Serrano Leon en 2010 et de Master 1 de Léo Vic en 2011.

Le projet **INVADIV (2010-2012)** a été financé par l'Université Européenne de Bretagne (UEB) et a démarré dans le but d'étudier l'impact de *Sargassum muticum,* déjà bien établie en Bretagne, sur la biodiversité et le fonctionnement de l'écosystème natif intertidal rocheux. Une partie du projet s'est intéressée à l'écologie chimique de *S. muticum*. Ce projet a financé les manipulations, analyses et indemnités de stage de Master 2 de Claudia Zea en 2012.

Le projet **Biotecmar (2009-2011)** est un programme européen INTERREG IVB, cofinancé par le Fonds Européen de Développement Régional, et s'intègre dans l'axe prioritaire n°2 du programme Espace Atlantique : « Environnement Maritime et Énergies Renouvelables ». Il met en relation de nombreuses structures de recherche en Norvège, en Espagne, en France, en Irlande et au Portugal. L'objectif du projet est de faciliter le développement de filières de production d'ingrédients à valeur ajoutée utilisant les produits marins sous-exploités. Cela implique un état des lieux des ressources actuelles, une aide au développement technologique, un rapprochement des acteurs de la filière (du laboratoire à l'industrie), et l'initiation d'actions-pilotes. Le projet Biotecmar a financé une part importante des analyses chimiques et du suivi écologique de populations réalisés au cours de cette thèse.

Le projet **INVASIVES (2013-2016)** est un programme européen ERA-NET/Seas-era, financé pour les partenaires français par l'Agence National pour la recherche (ANR). Il met en relation sept partenaires européens (Norvège, Islande, Belgique, France, Portugal) autour de l'impact du changement climatique global, et plus particulièrement d'une augmentation de la température de l'eau de mer sur les espèces invasives dans l'Atlantique Nord-Est. Le projet INVASIVES a co-financé l'achat de bacs de culture (Chapitre IV) et financé la participation à l'International Seaweed Symposium qui s'est déroulé à Bali en avril 2013.

Le projet **COSELMAR (2012-2015)** est un projet financé par la région Pays de la Loire et porté par l'Ifremer et l'Université de Nantes, institutions réunies au sein de la fédération de recherche Institut Universitaire Mer et Littoral (IUML, FR CNRS 3473), a pour objectif d'apporter une meilleure compréhension des écosystèmes littoraux et marins et des ressources associées, ainsi qu'une réflexion sur la gestion et la prévention des risques engendrés par les facteurs naturels et anthropiques. Notre étude s'inscrit dans l'axe 2 du projet concernant l'Exploitation et la valorisation des ressources marines. Le but principal du projet COSELMAR est d'intégrer des travaux scientifiques interdisciplinaires autour de ces questions afin de construire une véritable expertise sur les risques en milieu littoral et marin. Les analyses des échantillons en spectroscopie infrarouge ainsi que la séparation par membranes des molécules ont été notamment réalisées dans le cadre du projet COSELMAR. Ce projet a financé le stage de Master 2 de Carole Hersant en 2013.

Ainsi pour répondre aux trois objectifs cités plus haut, une **étude pluridisciplinaire**, liant des études écologiques et chimiques, a été menée.

Dans **un premier Chapitre**, après avoir décrit rapidement la classe des Phaeophyceae, les espèces étudiées sont présentées en s'appuyant sur leur systématique, leur mode de reproduction et leur écologie. Les sites d'études sélectionnés sont également décrits ainsi que les paramètres environnementaux les caractérisant. Enfin, après une brève description des macromolécules étudiées dans ce manuscrit, les composés de défense chimique d'intérêt principalement étudiés dans cette thèse, c'est-à-dire les composés phénoliques, seront décrits plus en détail. Enfin, les protocoles et méthodes d'analyses utilisés de façon redondante dans le manuscrit sont développés.

Dans le **Chapitre II**, après une description des méthodes actuellement utilisées pour extraire les substances naturelles, seront comparés les résultats obtenus par des procédés classiques et plus récents (éco-extraction). Les différents paramètres d'extraction agissent, dans les extraits obtenus, sur la teneur en composés phénoliques ainsi que sur leurs activités biologiques (anti-radicalaires et anti-oxydantes). Les expérimentations ont été menées sur trois espèces d'algues brunes afin d'estimer les paramètres incontournables influençant le rendement d'extraction et les activités antioxydantes associées.

Le **Chapitre III** de ce manuscrit est consacré à l'étude de la variabilité des macromolécules présentes chez la macroalgue brune *Sargassum muticum*, échantillonnée le long d'un gradient latitudinal (thermique) sur la façade atlantique Est. Dans un premier temps, deux techniques analytiques : la RMN HR-MAS et la spectroscopie infrarouge permettant d'obtenir l'empreinte chimique de l'algue ont été testées et comparées. Ce travail visait à quantifier et qualifier les compartiments biochimiques soumis à variations suivant l'origine de la population d'algues échantillonnées. Dans un deuxième temps, les teneurs en différentes macromolécules (lipides, protéines et polysaccharides) ont été mesurées. Un suivi par HPLC des teneurs en pigments majoritaires a également été effectué. L'intérêt était de suivre les variations spatiales de ces biomolécules chez une espèce à large distribution en Europe afin de comprendre comment elle s'adapte aux différents environnements colonisés.

Dans **un dernier chapitre** a été étudiée, chez *Sargassum muticum,* la variabilité d'un compartiment biochimique en particulier, celui des polyphénols, le long de ce même gradient latitudinal atlantique Est. Dans un premier temps les variations spatio-temporelles, inter- et intra-spécifiques des teneurs en composés phénoliques ont été suivies sur trois sites du littoral breton, ainsi que le long du gradient latitudinal. Ces composés présentant une grande variabilité en quantité mais également en qualité au sein des différents pays, ils ont été semi-purifiés par différentes méthodes décrites, permettant ainsi d'élucider le type de structure de ces composés par une analyse en RMN à deux dimensions (2D). Une étude de leur poids moléculaire, par l'utilisation de différentes techniques de séparation par la taille, a également été effectuée. Enfin, des expériences en milieu contrôlé ont été menées afin d'étudier l'effet de la température ou de l'intensité lumineuse sur la production de phlorotannins.

Enfin, ce manuscrit se termine par une **synthèse des principaux résultats obtenus** et **les perspectives** qu'offre ce travail de thèse.

CHAPITRE I

Présentation générale

I.1. Introduction

Dans ce premier chapitre sont définis les différentes notions et éléments indispensables à la bonne lecture de cette étude. Dans un premier temps, sont présentées les espèces de macroalgues brunes ayant servi de modèles durant cette thèse. La zone géographique étudiée et plus précisément les sites échantillonnés au cours de ce travail de thèse sont décrits et localisés. Les paramètres environnementaux pouvant varier suivant les sites, ceux-ci sont également décrits. Enfin, les algues, dans un milieu donné, subissent les aléas climatiques et des stress ponctuels modifiant leur contenu biochimique ; lors de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés à ces modifications moléculaires. Pour chacune des molécules étudiées seront donc présentées les possibles applications de celles-ci dans l'industrie ainsi que les paramètres environnementaux, réputés pour entrainer des variations qualitative et/ou quantitative de ces biomolécules. Parmi celles-ci les macromolécules telles que les lipides, les protéines et les polysaccharides ont retenu notre attention. Nous nous sommes également intéressés à la variabilité du contenu pigmentaire et phénolique chez les algues étudiées. Composés phénoliques particulièrement étudiés ici pour leur intérêt évident dans l'industrie pharmaceutique (cf Introduction) ; que nous décrirons donc avec précision. Aussi, seront présentés ci-après : leurs différentes formes chimiques, leurs rôles chez les algues ainsi que leurs propriétés et leurs applications industrielles. Enfin, quelques techniques analytiques utilisées de façon redondante tout au long de ce manuscrit seront décrites dans un dernier paragraphe, afin d'éviter les redondances et ainsi alléger le manuscrit.

I.2. Présentation des modèles biologiques

I.2.1. Position taxonomique et richesse spécifique de la classe des Phéophycées

L'ensemble des organismes inféodés aux milieux aquatiques, possédant de la chlorophylle *a* et donc généralement photosynthétiques, sont désignés communément sous le terme générique d'« algues » et classés selon leur couleur. On retrouve ainsi les algues brunes (ou Phaeophyceae), les algues rouges (ou Rhodophyceae) et les algues vertes (ou Chlorophyceae) (De Reviers, 2003a,b ; Cabioc'h *et al.,* 2006).

La classe des Phaeophyceae ou Phéophycées, appartenant à l'embranchement des Ochrophyta, regroupe des organismes strictement aquatiques et photosynthétiques se définissant par un ensemble de caractères communs tels que la structure des plastes, des cellules reproductrices flagellées ou la présence dans leurs plastes de pigments jaune-orangé. Ces pigments, des xanthophylles (dont la fucoxanthine) et des carotènes (dont le β-carotène) masquent les pigments verts (chlorophylles *a* et *c*) donnant aux Phaeophyceae leur couleur brune caractéristique (De Reviers, 2003a,b).

Dans la systématique, les algues ne forment pas un groupe taxonomique homogène. De récentes études montrent que les organismes traditionnellement appelés algues rouges et algues vertes appartiennent au règne des Plantae (tout comme les végétaux terrestres)

(Keeling *et al.,* 2005) (Figure I.1). Les Phaeophyceae sont plus éloignés dans la radiation des Eucaryotes et constituent un ensemble monophylétique classé dans le règne des Chromista et phylum Heterokontophyta Figure I.1).

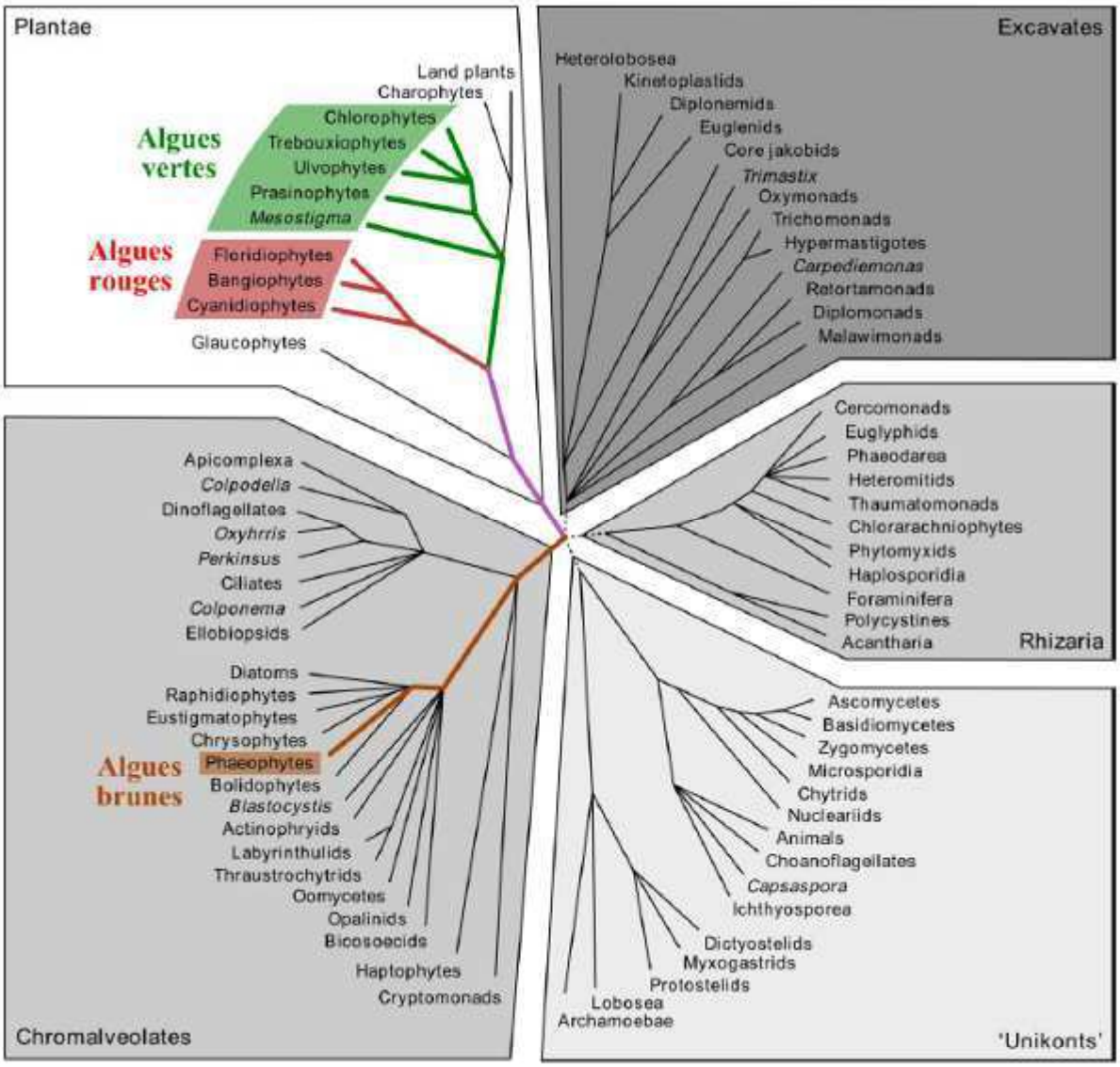


Figure I.1. Classification des eucaryotes d'après Keeling *et al.* (2005), avec position des principales classes de macroalgues. D'après Keeling *et al.* (2005) sur la base de phylogénies moléculaires et autres caractères moléculaires, ainsi que des données morphologiques et biochimiques.

Ainsi, l'ensemble des « algues », ne représentant pas un taxon unique, n'a aucun sens d'un point de vue phylogénétique et systématique. Ce terme est néanmoins employé communément par le grand public et par les scientifiques (De Reviers, 2003a,b) pour des raisons évidentes de compréhension. C'est pourquoi, dans ce travail de thèse, les Fucales et les Ectocarpales, organismes photosynthétiques, pluricellulaires, macroscopiques à l'âge adulte, de couleur brune, benthiques et marines seront désignées indifféremment sous les termes génériques de macroalgues brunes.

I.2.2. Description des espèces étudiées

Parmi les macroalgues brunes existantes sur l'estran breton et en Europe, 3 espèces ont été choisies pour leurs intérêts spécifiques et notamment pour leur teneur en composés d'intérêts et en particulier en composés phénoliques. Deux espèces appartenant à l'ordre des Fucales, *Ascophyllum nodosum* et *Sargassum muticum*, et une espèce appartenant à l'ordre des Ectocarpales, *Pylaiella littoralis*, ont été récoltées. Elles se répartissent sur l'estran à différents étages (Figure I.2). Les trois espèces, leur morphologie et leur écologie sont décrites ci-dessous.

Figure I.2. Répartition sur l'estran des trois espèces sélectionnées dans cette étude, *Ascophyllum nodosum, Sargassum muticum* et *Pylaiella littoralis*.

I.2.2.1. *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis

Domaine : Eukaryota
Phylum : Ochrophyta (Heterokontophyta)
Classe : Phaeophyceae
Ordre : Fucales
Famille : Fucaceae
Genre : *Ascophyllum*
Espèce : *Ascophyllum nodosum*

Ascophyllum nodosum est une espèce d'algue de la classe des ***Phaeophyceae*** et de l'ordre des ***Fucales,*** famille ***Fucaceae***. Cette espèce est très commune le long des côtes rocheuses de l'Atlantique Nord, où elle forme des colonies denses dans la zone de balancement des marées. On la retrouve plus précisément sur les rochers de la zone médiane de l'étage médiolittoral (mi-marée). Elle vit sur les côtes Nord-Est (du Spitzberg au Portugal) et Nord-Ouest de l'océan Atlantique, en Manche et en Mer du Nord.

Cette algue brune au thalle brun-jaune à vert olive foncé mesure au maximum 1,00 à 1,50 m. *Ascophyllum nodosum* est une algue pérenne dont les thalles peuvent atteindre une longévité de plus de 25 ans. L'algue est fixée à son substrat par un crampon étroit. Son thalle est constitué de longues lanières résistantes, lisses, arrondies près du disque basal puis aplaties. Le thalle, ramifié, se divise plusieurs fois par dichotomie en des lanières secondaires. L'axe principal aplati présente à intervalles assez réguliers des renflements situés dans l'épaisseur du thalle : ce sont des vésicules aérifères ou aérocystes remplis de gaz qui jouent le rôle de flotteurs. Latéralement apparaissent de courtes ramifications fines qui évoluent en réceptacles portant les conceptacles où se prépare la reproduction sexuée par la production des gamètes (Figure I.3).

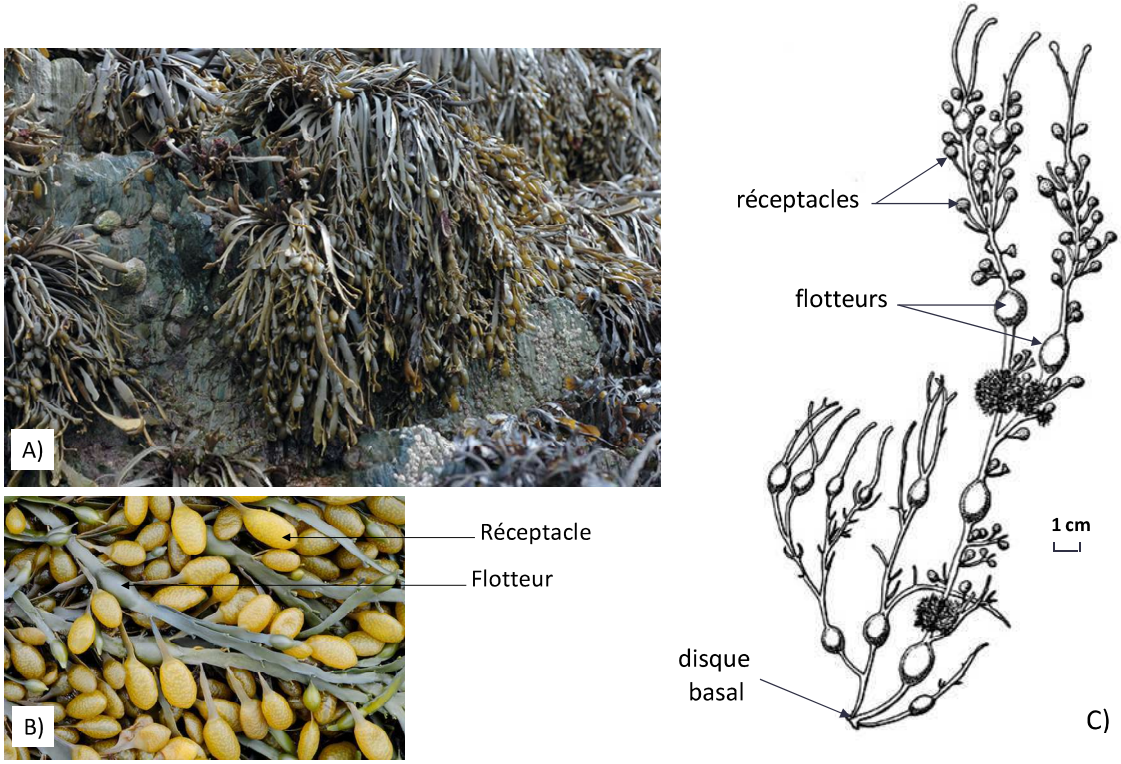


Figure I.3. Présentation d'*Ascophyllum nodosum*. A) Individus fixés sur des rochers sur l'estran, B) Détail des réceptacles et flotteurs et C) Schéma d'un thalle *d'Ascophyllum nodosum* (dessin de M.C. Noaille)

La reproduction de cette espèce se fait assez précocement si on la compare aux autres Fucales puisqu'elle intervient en hiver et au printemps. L'espèce est dioïque : les organes reproducteurs mâles et femelles se trouvent sur des pieds séparés. Ces organes reproducteurs ou réceptacles sont portés par des pédoncules de 1 à 2 cm, situés au niveau des points de ramification. Ils sont ovoïdes et globulaires. A maturité, les réceptacles mâles sont jaune clair et les réceptacles femelles vert olive. Ces réceptacles contiennent chacun une centaine de conceptacles dans lesquels se concentrent les gamètes (Aberg et Pavia, 1997). Ces réceptacles ont une durée de vie d'environ 1 an et tombent au printemps. Le cycle de reproduction d'*Ascophyllum nodosum* est présenté en Figure I.4.

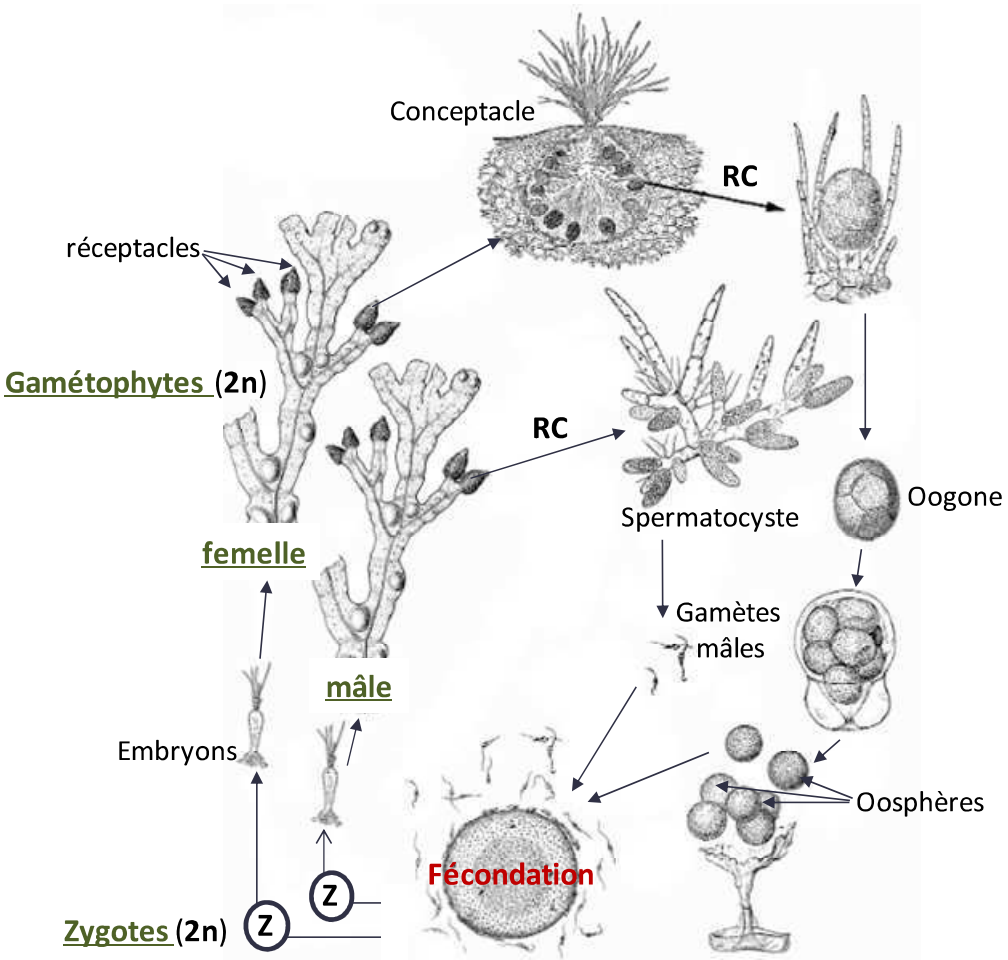


Figure I.4. Cycle de reproduction des Fucales : exemple du cycle des *Fucus sp.* (Adapté de Lee, 1999). RC : Réduction chromatique.

Ascophyllum nodosum est vivace et forme, à partir de la deuxième année, un aérocyste par an. Le nombre de flotteurs le long d'un axe permet ainsi d'évaluer l'âge minimum d'un individu ; une régénération des axes étant possible à partir du crampon. Des thalles âgés au minimum de 14 à 15 ans ont été observés en Bretagne. Il a par ailleurs été montré que la taille des thalles était dépendante de la saison avec un développement maximum en été et minimum en hiver. La matière sèche est également plus importante en été et plus faible l'hiver (Connan, 2004).

Cette espèce était principalement utilisée comme source d'engrais pour sa haute teneur en macro éléments (N, P, K,..) et oligoéléments (Mn, Cu, Fe, Zn) dans l'agriculture (collectées par les goémoniers) ou encore en tant qu'aliment pour le bétail. De nos jours elle est plutôt utilisée pour l'extraction d'alginates (FRCIVAM Bretagne : Usage traditionnel et proto-industriel des algues en Bretagne, octobre 2006) ou la préparation de composants alimentaires ; l'arrachage des thalles pour la fabrication d'engrais ayant été réglementée (Direction régionale des affaires maritimes de Bretagne : Arrêté préfectoral du 17 avril 2009 relatif à l'exploitation durable des goémons de rives sur le littoral de la Bretagne). Dans cette étude nous nous sommes intéressés aux composés phénoliques que l'espèce produit en grande quantité. Ainsi, *Ascophyllum nodosum* représentait plusieurs intérêts pour notre étude. On la

retrouve en effet en biomasse importante sur l'estran, et ce, quelque soit la saison. Elle est de plus facilement récoltable. Les thalles contiennent des composés phénoliques en quantité non négligeable puisqu'ils peuvent représenter jusqu'à plus de 8%MS au printemps et plus de 7% en automne (Connan, 2004). Ces composés sont souvent de haut poids moléculaire : supérieurs à 12-14 KDa et liés à des polysaccharides ce qui rend leur extraction et surtout leur purification assez difficile (Ragan et Glombitza, 1986 ; Connan, 2004). Ils ont également montré des activités antioxydantes intéressantes. Ces activités étant plus importantes au printemps et/ou en automne suivant les sites d'échantillonnage (Connan, 2004).

I.2.2.2. *Pylaiella littoralis* (Linnaeus) Kjellman

Domaine : Eukaryota
Phylum : Ochrophyta (Heterokontophyta)
Classe : Phaeophyceae
Ordre : Ectocarpales
Famille : Acinetosporaceae
Genre : *Pylaiella*
Espèce : *Pylaiella littoralis*

Pylaiella littoralis est une algue de la classe des ***Phaeophyceae***, de l'ordre des ***Ectocarpales*** et famille des ***Acinetosporaceae***. Cette espèce se trouve en épiphyte ou en épilithe, dans la zone intertidale et subtidale peu profond. On peut la retrouver dans des milieux marins ou estuariens. Elle est très commune sur les côtes de la Manche. Mais on la retrouve également sur nos côtes en assez faible quantité souvent épiphyte sur des Fucacées comme *Fucus serratus* ou *Ascophyllum nodosum* par exemple. Annuelle, elle peut se développer par bloom au alentour de l'automne. On la retrouve également dans toute l'Europe sur la façade atlantique et en Méditerranée mais également dans le monde entier : majoritairement sur les côtes d'Afrique du Sud, sur la côte Est Australie et sur la côte Nord-Ouest des États-Unis.

Son thalle est jaunâtre à brun foncé et composé de filaments unisériés de 60 µm de diamètre environ, branchés sur l'axe principal de manière opposée et irrégulière (Figure I.5). Les filaments sont de petite taille et atteignent 200 à 500 mm de long. Occasionnellement des divisions cellulaires longitudinales peuvent avoir lieu. Le système basal est constitué de filaments libres et rhizoïdes. Les cellules contiennent de nombreux chloroplastes discoïdes. Les sporocystes sont uniloculaires ou pluriloculaires et intercalés en série dans la longueur du filament et quelques fois en position terminale.

La récolte de cette espèce est assez fastidieuse, la principale difficulté résidant dans la différenciation par rapport aux autres genres d'Ectocarpales retrouvées également sur nos côtes telles que : *Ectocarpus* ou *Hincksia*. Il s'agit de les différencier en regardant au microscope chacun des pieds arrachés (forme des chloroplastes et position des sporocystes par rapport au thalle) afin de déterminer le genre récolté.

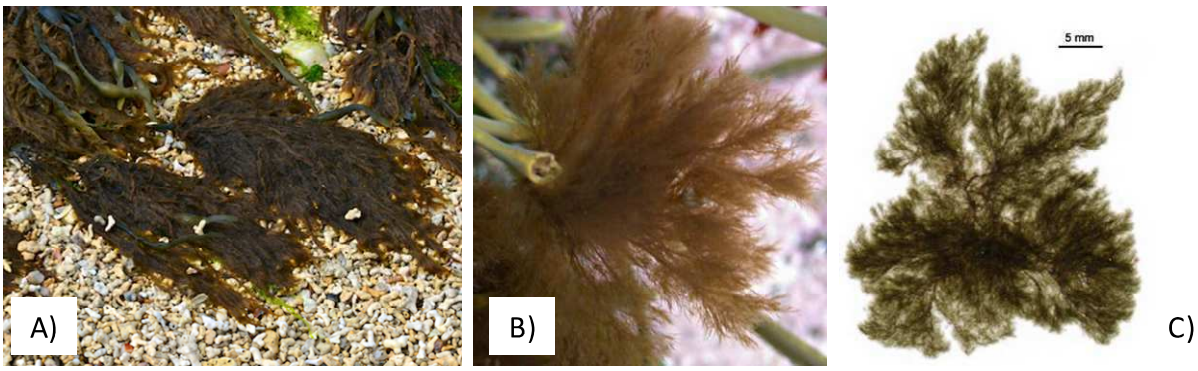


Figure I.5. Présentation de *Pylaiella littoralis*. A) Individus fixés en épiphytes sur *Ascophyllum nodosum*, B) Détail des filaments (photo de M.D.R. Guiry) et C) Thalle entier de *Pylaiella littoralis* (photo de T. Le Goff).

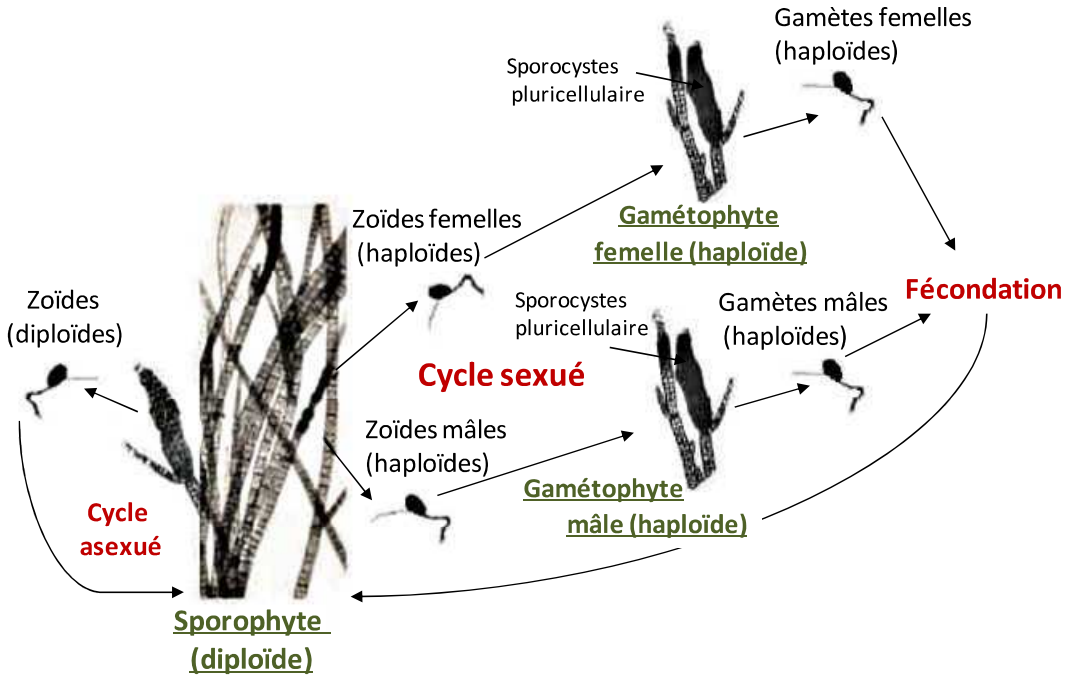


Figure I.6. Le cycle de vie de *Pylaiella littoralis* (Le cycle sexué de *P.littoralis* est aplodiplobiotique isomorphe) d'après M-P. Oudot-Le Secq (2000).

Son intérêt principal provient notamment de cette ressemblance avec l'algue *Ectocarpus siliculosus* dont le génome a été séquencé (Dittami *et al*., 2009 ; Cock *et al*., 2010). Par ailleurs, *P. littoralis* a souvent été utilisée comme modèle d'étude pour ses caractéristiques morphologiques et cytologiques "primitives" : filaments unisériés, croissance diffuse, présence de pyrénoïdes (Van den Hoek *et al*., 1995). Un autre intérêt provient du fait que, comme d'autres Ectocarpales, son maintien et même sa culture en laboratoire est maîtrisée. Des souches ont été établies à partir d'un filament unique qui portait à la fois des sporocystes uniloculaires en rangée intercalaire (caractéristique du genre *Pylaiella*) et des sporocystes pluriloculaires en position terminale. A priori, le filament d'origine était donc diploïde (*cf.* le cycle haplodiplophasique décrit Figure I.6). Certaines souches ont même été rendues axéniques (Loiseaux et Rozier, 1978).

I.2.2.3. *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt

Domaine : Eukaryota
Phylum : Ochrophyta (Heterokontophyta)
Classe : Phaeophyceae
Ordre : Fucales
Famille : Sargassaceae
Genre : *Sargassum*
Espèce : *Sargassum muticum*

Sargassum muticum est une macroalgue de la classe des **Phaeophyceae, appartenant à** l'ordre des **Fucales** et de la famille des Sargassaceae. Cette algue tolère les milieux à faible et fort hydrodynamisme mais elle est cependant plus abondante en mode abrité. Elle connaît une large distribution bathymétrique, de l'étage médiolittoral jusque dans l'infralittoral. La plupart du temps, elle se développe dans des cuvettes du médiolittoral et elle peut constituer de fortes biomasses pendant la période estivale. Cette espèce à large répartition (*cf.* Encadré I.1) a été introduite en 1973 sur les côtes européennes suite à l'importation d'huîtres creuses du Japon (Farnham, 1980). Elle sera ensuite signalée en 1975 à Vaaut La Hougue, en 1980 près de Roscoff (Finistère) et en 1981 à Fort Bloqué (Morbihan).

Cette algue, fixée sur un disque basal encroûtant, est constituée d'un ou plusieurs axes principaux pérennes, de quelques centimètres de long d'où partent des rameaux primaires saisonniers pouvant atteindre plusieurs mètres de long (appelés latérales), eux-mêmes pourvus de rameaux secondaires possédant des frondes effilées et des aérocystes (Figure I.7). Durant la période estivale, les organes reproducteurs apparaissent sous la forme de vésicules cylindriques, appelées réceptacles, où sont produites les cellules de la reproduction.

A maturité, à la fin du printemps en Bretagne (Plouguerné *et al*., 2006), les organes reproducteurs apparaissent sur certaines latérales, sous la forme de vésicules cylindriques appelées réceptacles. *Sargassum muticum* est une espèce monoïque, les gamètes mâles et femelles sont situés sur le même réceptacle mais au sein de conceptacles différents (Fletcher et Fletcher, 1975). La fécondation est externe, mais l'embryon reste fixé et se développe sur l'individu parent dans les premiers stades. C'est un zygote pluricellulaire qui est libéré dans l'eau de mer. Son cycle est monogénétique diplophasique (Figure I.8). Une seule génération gamétophytique est produite au cours du cycle de vie de la Sargasse. Cette génération devient mature durant la période estivale et produit des gamètes dans un organe reproducteur appelé réceptacle. Un seul type d'individu est présent dans chaque population et il produit les deux types de gamètes, mâle et femelle. Les gamètes sont libérés lorsque la mer remonte, après une grande marée. Les gamètes mâles se dispersent dans le milieu marin et vont à l'encontre des gamètes femelles, restés fixés au niveau des réceptacles. La fécondation a lieu en surface de réceptacle ; l'embryon y reste fixé et se développe sur l'individu parent jusqu'à un stade pluricellulaire. C'est une jeune plantule qui est ensuite libérée dans l'eau de mer et qui se fixera sur un substrat dur (roche, débris…). La longévité de *Sargassum muticum* est de l'ordre de 3-4 ans.

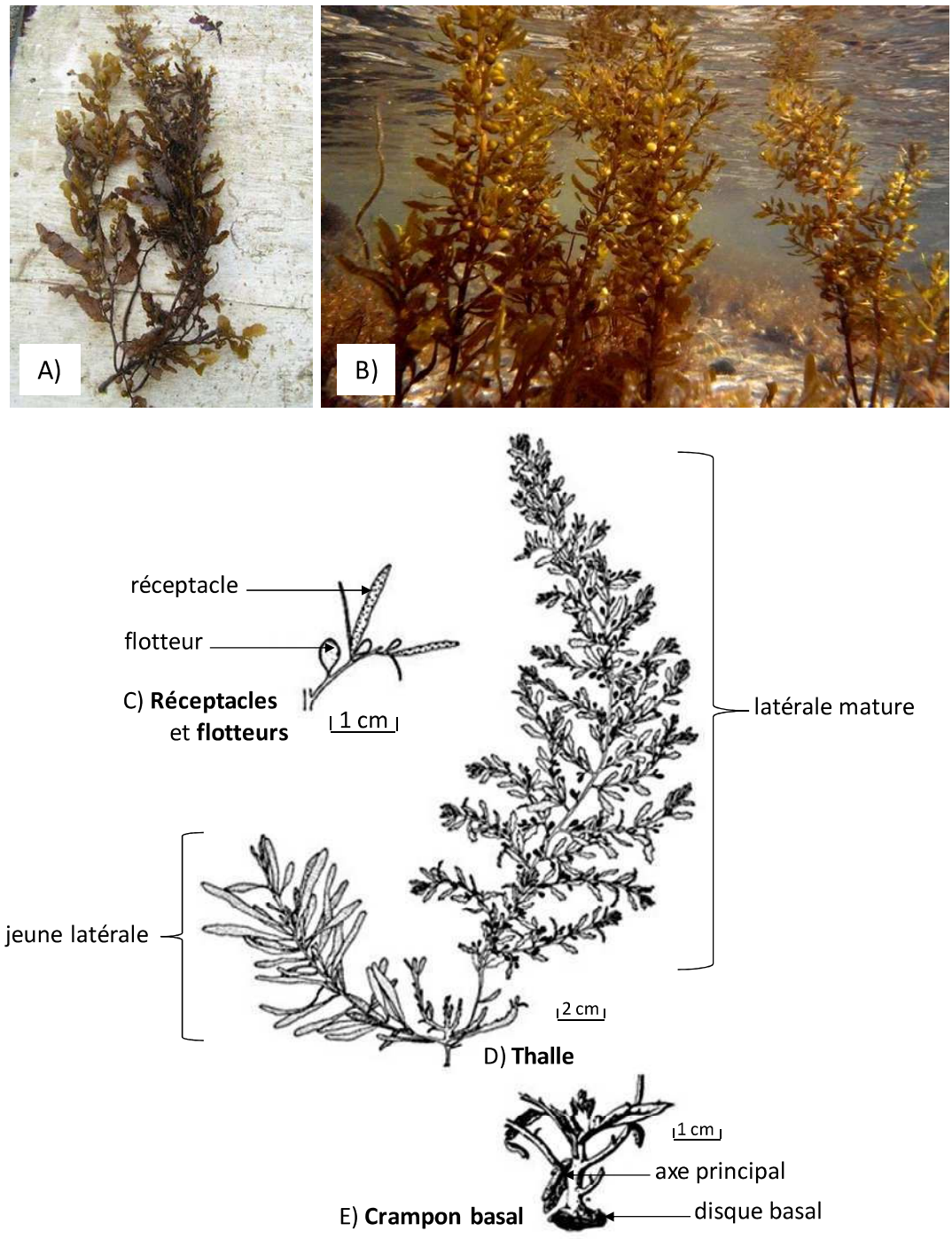


Figure I.7. Présentation de *Sargassum muticum* A) Individus fixés sur des rochers sur l'estran, B) Détail des réceptacles et flotteurs et C, D, E) Morphologie générale d'un thalle de *Sargassum muticum* avec : C) fragment de latérale présentant des réceptacles et des flotteurs. D) latérale droite présentant des flotteurs et jeune latérale gauche présentant des frondes plus grandes. E) détail de la partie basale présentant l'axe principal pérenne ainsi que le disque basal. (C et D d'après Coppejans, 1995 ; E d'après Karlsson, 1988).

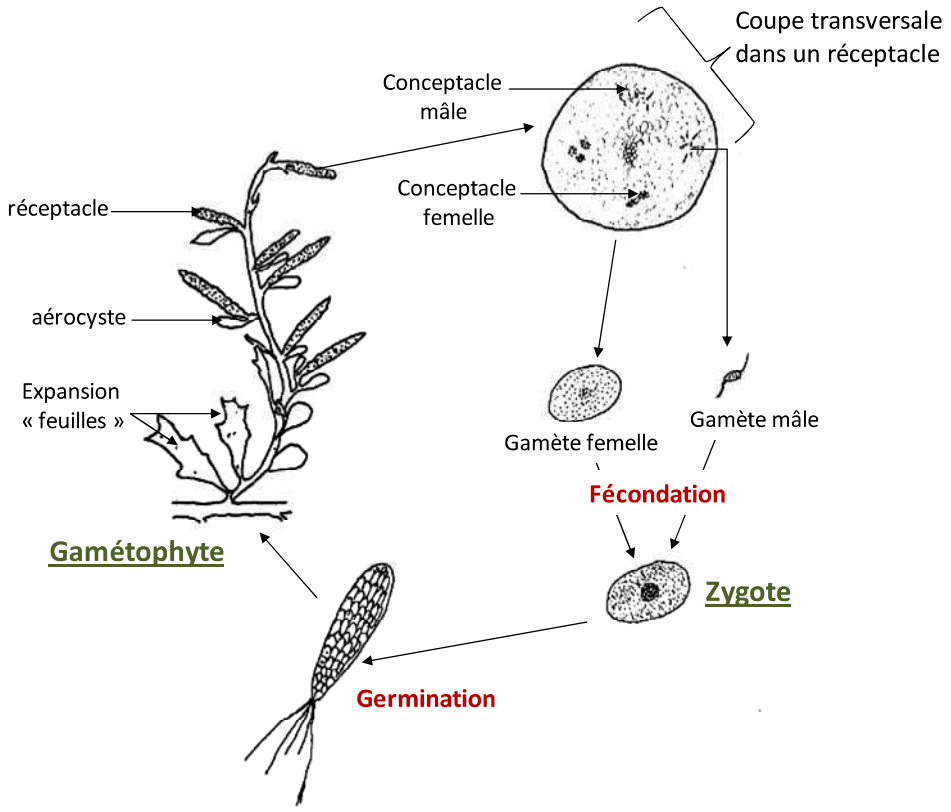


Figure I.8. Reproduction sexuée oogame et cycle schématique de *Sargassum muticum* (cycle monogénétique diploïde). D'après T. Givernaud (1984).

NB : *Sargassum muticum* est un modèle d'étude suivi au laboratoire depuis 12 ans. Elle a déjà fait l'objet de nombreux travaux de phylogénie (Yoshida *et al.,* 2000 ; Stiger *et al.*, 2000, 2003), de travaux de thèse concernant : la biologie des populations (Plouguerné,2006 ; Le Lann, 2009), l'extraction de composés phénoliques (Connan, 2004 ; Plouguerné,2006 ; Le Lann, 2009)) et l'utilisation de la biomasse comme source de composés à activité antifouling (Plouguerné, 2006) et/ou antioxydante (Le Lann, 2009). Ainsi, diverses molécules, responsables de la défense antifouling, ont pu être isolées (Plouguerné *et al.,* 2008, 2010a). Une étude complète a été menée sur diverses propriétés des composés phénoliques ainsi que de la fucoxanthine présents chez la Sargasse (Le Lann *et al*., 2008, 2012a, 2012b).

Nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés à cette espèce pour ses nombreux intérêts dans la production de molécules actives. De plus, l'opportunité d'obtenir des algues provenant de différents pays européens (*cf.* Introduction) nous a permis d'approfondir les recherches sur les liens entre la production des molécules étudiées et les paramètres environnementaux. En effet cette espèce invasive est présente le long des côtes européennes suite à son introduction en Angleterre (*cf.* Encadré I.1).

Encadré I.1. **Historique d'introduction et répartition actuelle de la macroalgue brune *Sargassum muticum***

Sargassum muticum, très répandue dans le Pacifique Nord, a été introduite sur les côtes européennes, via l'Angleterre, probablement suite à l'importation d'huîtres creuses du Japon, *Crassostrea gigas* Thunberg, dans les années 1960. Elle a été signalée pour la première fois à Bembridge, sur l'île de Wight, au sud de l'Angleterre en 1971 (Farnham, 1980). *S. muticum* s'est ensuite dispersée sur les côtes du Solent (Fletcher et Fletcher, 1975; Gray et Jones, 1977; Jephson et Gray, 1977) et de la Cornouaille anglaise jusqu'à Plymouth (Boalch et Potts, 1977). Dans le même temps, introduite par l'aquaculture, l'espèce « a traversé » la Manche et gagné la Normandie, où elle a été signalée en 1975. Dès la fin des années 1970, la Sargasse japonaise est signalée en Bretagne : dans les Côte d'Armor en 1978, dans le Finistère et le Morbihan en 1981. En Méditerranée, l'espèce a d'abord été signalée, au début des années 1980, dans l'Etang de Thau (Critchley *et al*., 1983), puis à Banyuls-sur-mer au milieu des années 1980 (Lorraine, 1989) et dans la mer adriatique à Venise en 1992 (Curiel *et al.,* 1998).

En Europe, l'aire de répartition de *S. muticum* s'étend actuellement le long de l'Atlantique du Portugal à la Norvège et du côté méditerranéen de l'Espagne à l'Italie (Figure I.9). L'espèce a également été recensée en Irlande du Nord ainsi qu'en Ecosse (Connan, com. pers.). Néanmoins, la distribution de *S. muticum* n'est toujours pas stable et elle tend à s'élargir d'année en année.

Les populations Nord atlantiques et méditerranéennes de *Sargassum muticum* sont considérées comme invasives (Norton, 1976). C'est à dire que, de part certaines de ses caractéristiques intrinsèques, elle est capable de proliférer rapidement et au détriment d'autres espèces (Norton, 1981; Baer et Stengel, 2010) :

Sa reproduction est performante et s'étale sur une période assez large (4 à 5 mois par an).

Sa capacité de dispersion, comme de très nombreuses espèces de *Sargassum* (Stiger et Payri, 1999a,b), est grande. *S. muticum* présente deux types de dispersion: (1) marginale, par la production de zygotes viables qui sont libérés et qui vont se fixer à proximité du thalle parental, donc favorisant une colonisation locale ; et (2) par saut, par laquelle les latérales fertiles se détachent et flottent à la surface de l'eau, et peuvent ainsi libérer des zygotes qui, selon la disponibilité en substrat pourront se fixer à de très grandes distances du thalle d'origine, favorisant ainsi une colonisation d'espaces plus lointains. Elle a une croissance rapide au printemps : elle peut grandir jusqu'à 10 cm par jour (Belsher, 1991). Elle présente aussi une grande aptitude de fixation sur n'importe quel support fixe ou mobile, et une faculté d'adaptation importante grâce à une grande tolérance à la température et à la salinité.

Après avoir proliféré, l'espèce semble, de nos jours, avoir atteint un état d'équilibre et coexiste dorénavant avec les espèces natives (Le Lann et Stiger-Pouvreau, 2009, Le Lann *et al.,* 2012a). Cependant, aujourd'hui, en période estivale, sa prolifération et sa grande taille gène localement certaines activités humaines comme la pêche, l'accès aux parcs ostréicoles et la navigation. Elle a aussi un impact écologique et économique par sa colonisation d'espaces naturels.

Face à ces problèmes, diverses actions ont été entreprises pour limiter voire éradiquer *Sargassum muticum* des côtes françaises (Belsher, 1991). Toutes ces tentatives ont échoué.

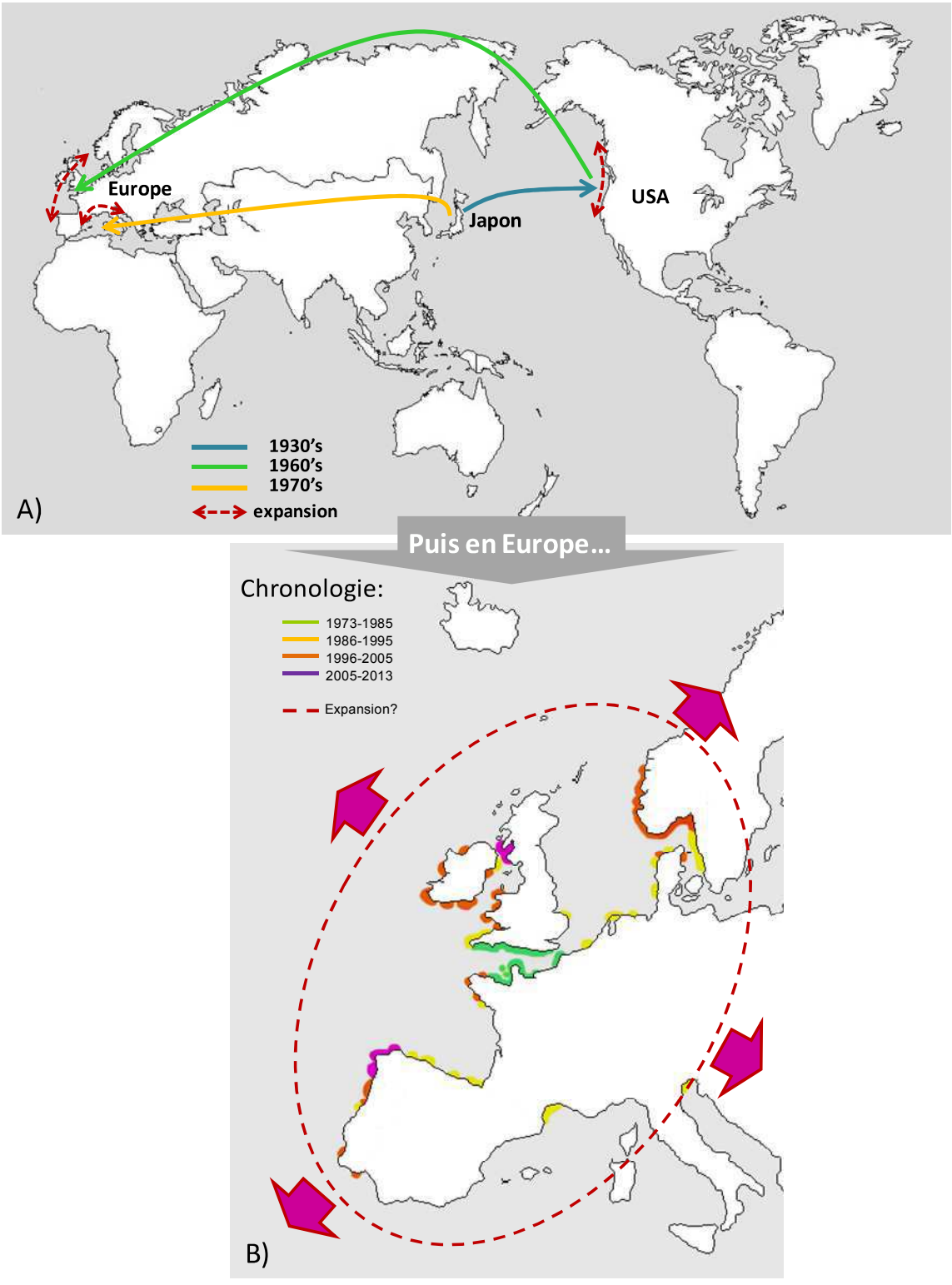


Figure I.9. A) Historique d'introduction de *Sargassum muticum* en Europe d'après Le Lann (2009) et B) Carte de distribution de *Sargassum muticum* en Europe d'après J. César et M. Incera (Pers. Comm.) (Après l'examen de 25 publications présentant la répartition de *S. muticum* le long des côtes atlantiques et méditerranéennes d'Europe).

Afin de comprendre comment ces espèces se maintiennent et prolifèrent sur le littoral breton, nous avons mené un suivi temporel des populations de *Ascophyllum nodosum* et de *Sargassum muticum* à la pointe Bretagne. Cette étude présentée au chapitre IV a permis de mettre en avant les sources de variabilité spatiotemporelles, inter-spécifiques et intra-spécifiques dans la composition chimique des macrolagues brunes étudiées. Ainsi, trois sites ont été choisis en Bretagne pour étudier ces variations. D'autre part, *Sargassum muticum* a été échantillonnées au cours du printemps 2011 en Europe afin d'étudier la variabilité de son contenu biochimique le long des cotes atlantiques (Chapitre III). L'ensemble des sites étudiés au cours de notre étude sont présentés ci-après.

I.3. Description des sites d'étude

Au cours de ce travail, deux zones géographiques ont été étudiées en fonction du but recherché.

1/ Les premières études effectuées lors de cette thèse ont été menées sur des algues provenant de la pointe Bretonne. La richesse spécifique en algues marines des côtes bretonnes et leur accessibilité par rapport à la situation géographique du laboratoire nous ont poussé à choisir ce lieu d'étude. D'autre part, les macroalgues brunes y sont particulièrement abondantes et facilement accessibles à marée basse. Les algues provenant de cette zone géographique ont donc été utilisées pour les études préliminaires (choix de l'espèce à étudier et premiers tests) ainsi que pour l'étude des procédés d'extraction des composés phénoliques (chap. II).

2/ Dans une seconde partie de notre étude nous avons choisi les côtes européennes (façade atlantique) d'une part pour la rareté des études menées à grande échelle géographique et d'autre part pour l'opportunité d'une campagne de récolte organisée dans le cadre du projet BIOTECMAR (*cf.* Introduction). La zone géographique étudiée s'étendait du Sud de la Norvège au Sud du Portugal. Les algues ont été échantillonnées dans trois sites de cinq pays situés le long d'un gradient latitudinal Nord-Sud. Les cinq pays échantillonnés ont été la Norvège, l'Irlande, la France, l'Espagne et le Portugal.

1.3.1. Généralités sur la colonne d'eau

Deux environnements différents sont observés dans les océans du globe: l'environnement pélagique, lié aux masses d'eau (organisme nageurs, libres dans la colonne d'eau par exemple) et l'environnement benthique lié aux fonds marins (organismes fixés aux rochers par exemple ou vivant aux fond des océans). Les macroalgues étudiées dans ce travail de thèse sont des espèces benthiques. De ce fait, seul cet environnement est décrit ci-dessous. L'environnement benthique peut être découpé en plusieurs zones comme présenté sur la Figure I.10.

La zone littorale est divisée en trois étages. Un étage est défini comme un espace vertical du domaine benthique au sein duquel règnent des conditions physico-chimiques relativement homogènes. Le premier est l'étage supralittoral. C'est la zone des embruns où

vivent les lichens et les végétaux halophiles terrestres. Puis, apparait l'étage médiolittoral. Cet étage correspond à la zone de balancement des marées, située entre le niveau moyen des hautes mers de vives eaux et celui des basses mers de vives eaux. L'étage médiolittoral est aussi appelé estran ou zone intertidale. Enfin, l'étage infralittoral correspond à une zone immergée en permanence située entre le niveau moyen des basses mers de vives eaux et la limite des peuplements à macroalgues photophiles.

La zone profonde est constituée de quatre étages dont le premier est l'étage circalittoral situé du bas des peuplements à macroalgues photophiles jusqu'à la limite du plateau continental. Cet étage circalittoral, présentant des variations environnementales faibles, comporte deux zones distinctes : le circalittoral côtier au sein duquel poussent des macroalgues sciaphiles et le circalittoral du large au sein duquel ne vit aucune macroalgue à thalle dressé. Ensuite se succèdent, l'étage bathyal, correspondant à la pente continentale, entre 200 et 4000 m de profondeur en moyenne et l'étage abyssal, situé au-delà de 4000 m de profondeur. L'étage abyssal constitue 80% du domaine benthique. Les fosses océaniques, dont les profondeurs dépassent les 6 000 m, forment le dernier étage de la zone profonde : l'étage hadal.

Dans l'environnement marin, les macroalgues ne sont retrouvées qu'au niveau des étages médio-, infra- et circalittoral (Figure I.10). En effet, leur répartition bathymétrique est limitée, notamment par leur capacité photosynthétique mais aussi par la turbidité de l'eau qui va influencer la pénétration des radiations lumineuses. On caractérise ainsi une zone photique (Figure I.10), de la surface jusqu'à 200 mètres de profondeur, où la photosynthèse est possible, par opposition à la zone aphotique sous-jacente, au sein de laquelle la lumière ne pénètre pas, et où le développement d'organismes photosynthétiques tels que les algues est impossible (Figure I.10).

Néanmoins, les macroalgues montrent une diversité et une abondance maximales dans les 30 premiers mètres. Au niveau de la zone intertidale, le phénomène des marées engendre des cycles d'émersion et d'immersion qui entraînent des fluctuations importantes des paramètres physico-chimiques comme la température ou la salinité. Ces variations vont conditionner l'étagement des êtres vivants, et notamment des populations de macroalgues brunes (voir paragraphe I.5.1.2). Cet étagement est d'autant plus marqué que les amplitudes de marée, et donc le marnage, sont importants.

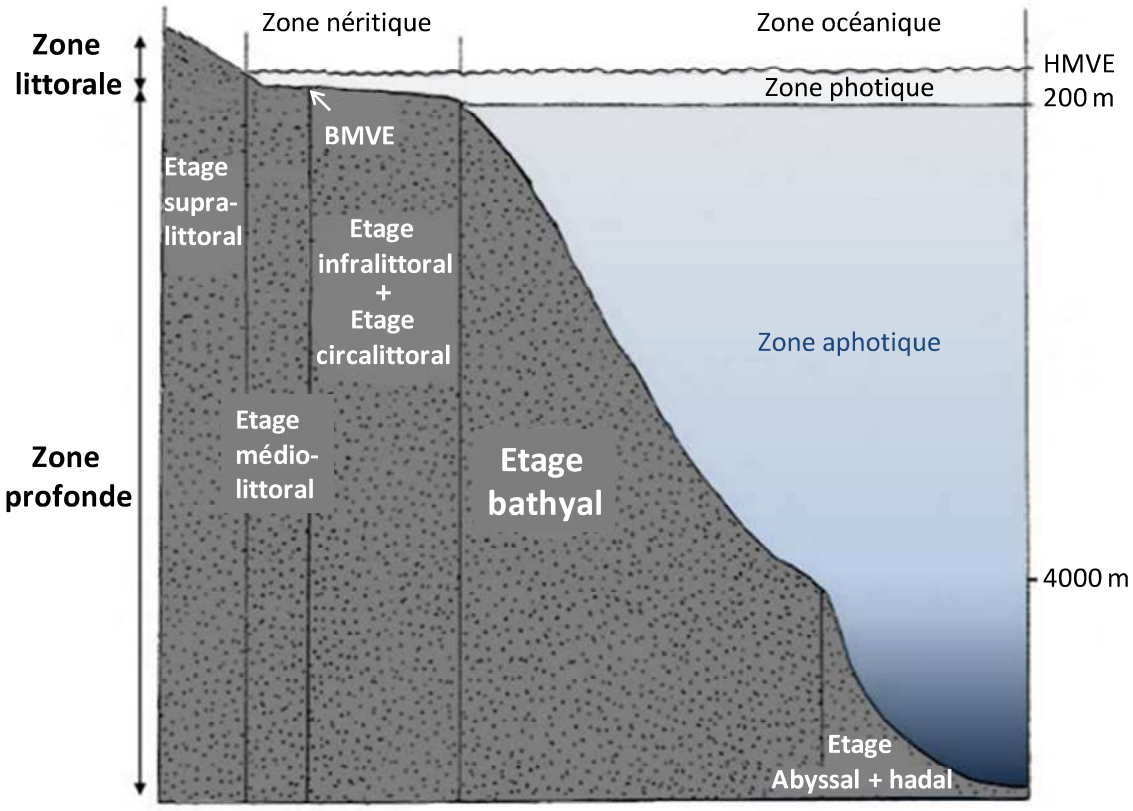


Figure I.10. Divisions de l'environnement marin (d'après Lee, 1999). HMVE : niveau moyen des hautes mers de vives eaux, BMVE : niveau moyen des basses mers de vives eaux.

I.3.2. Description des sites étudiés en France

Une partie des études a été menée sur des échantillons prélevés en France sur la façade atlantique en Bretagne et plus précisément à la pointe du Finistère.

I.3.2.1. Caractéristiques des côtes bretonnes

La Bretagne est située à l'extrémité Nord-Ouest de la France. Cette région, bordée aux quatre cinquième par la mer est la région française présentant la plus grande longueur de côtes (40% du linéaire côtier de la Métropole) : environ 2 500 km de côtes en incluant les nombreuses iles situées dans cette zone. La Bretagne baigne dans deux masses d'eau distinctes : au Sud dans l'Océan Atlantique présentant des eaux stratifiées (en été) par une thermocline entre les eaux chaudes de surface et les eaux froides de fond et au Nord (principalement autours des archipels d'Ouessant, de Molène et de Sein, en Manche et en Mer d'Iroise) dans des eaux plutôt homogènes brassées en toutes saisons par la houle et les courants.

a) Climat

La Bretagne, située à l'Ouest de l'Europe, sur la côte atlantique, bénéficie d'un climat tempéré océanique. Les étés y sont frais et les hivers doux. Les températures varient ainsi

entre 7 et 17°C en moyenne au cours de l'année. L'atmosphère y est assez humide. Ce climat provient d'une part de la dérive Nord-Atlantique qui crée un mouvement d'eaux océaniques prolongeant le *Gulf Stream* et d'autre part d'un système atmosphérique dominé par la présence de l'anticyclone des Açores et de la zone dépressionnaire d'Islande. Sur le littoral atlantique les étés sont assez chauds et l'ensoleillement important : entre 1 800 et 2 080 heures/an. Les précipitations restent dans les normales françaises voire au-dessous : 800-1000 mm/an. Les gelées ainsi que la neige sont rares, surtout dans les îles. La présence de vents importants est une autre caractéristique de ce climat.

b) Substrat

Le littoral breton est majoritairement rocheux, contrairement aux littoraux de Normandie (hormis le Cotentin) et de Vendée par exemple qui sont essentiellement sableux. La myriade d'îles et d'îlots qui parsème le littoral n'est que l'échine d'un énorme platier rocheux de 3 407 km^2 qui correspond au prolongement, sous la mer, du massif armoricain. Les fonds marins bretons forment une mosaïque exceptionnelle d'habitats en Europe : roches, cailloutis, graviers, sables et vases se côtoient sur de petites surfaces et favorisent une grande biodiversité.

c) Température et salinité de l'eau de mer

La température de l'eau varie au cours de l'année mais reste comprise entre 11 et 19°C à l'abord des côtes. Les eaux du large sont salées (35‰ ou psu) et claires. Cette clarté des eaux océaniques, notamment autour des îles, permet le développement de peuplements considérables de végétaux marins dont les phanérogames (Hily *et al.,* 1999) et les macroalgues (Floc'h, 1967). Aux abords des côtes, les eaux sont en revanche légèrement moins salées et turbides à cause des panaches fluviaux notamment de la Loire et de la Vilaine dans la partie Sud de la Bretagne (Le Corre et Birrien, 1985) mais aussi à cause d'un réseau hydrographique dense : cours d'eaux et nombreux bassins versants débouchant dans la mer.

d) Hydrodynamisme

Sur le littoral breton, le marnage est important. En période de marée de vives eaux, son maximum est de 14 m dans la baie du Mont-Saint-Michel, puis il diminue en allant vers l'Ouest (Figure I.11). Il est de l'ordre de 8 m à Roscoff, de 6 m à Brest et se réduit en allant vers le Sud de la Bretagne pour se stabiliser à une valeur proche de 5 m de la Pointe du Raz à Saint Nazaire. La marée, en créant le déplacement de masses d'eau importantes sur un laps de temps court, provoque la formation de courants importants près des côtes. Ces courants sont souvent forts dans les zones de rétrécissements (Goulet de Brest par exemple) et au contraire, plus faibles dans les baies, ce qui permet aux sédiments fins de s'y déposer. Sur la côte Nord, les courants de marée atteignent souvent des vitesses de l'ordre de 3 nœuds (soit 1,5 m/s) et jusqu'à 9 nœuds entre les archipels de Molène et Ouessant. Sur la côte Sud, ces courants sont rotatifs et ne font, généralement, pas plus de 0,5 à 1 nœud. La Bretagne est exposée directement à la houle de l'Atlantique dont l'impact dépend de son origine (direction, période) ainsi que de la morphologie du littoral. Les fortes houles dominantes sont orientées Ouest/Sud-Ouest. Le choc de la houle est amorti par les îlots et les récifs côtiers qui agissent

comme des barrières naturelles. Ses effets changent également en fonction de l'orientation du trait de côte (Bellessort et Migniot, 1987).

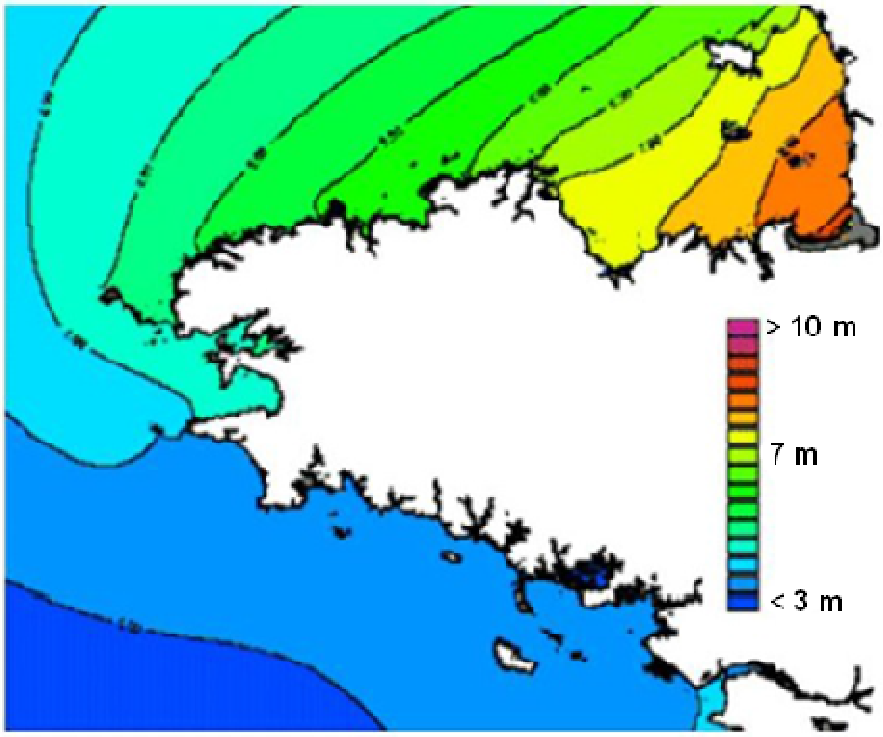


Figure I.11. Marnage moyen (m) sur les côtes bretonnes (d'après [1][2] dans Connan, 2004).

Toutes ces caractéristiques, propres au littoral breton (substrat rocheux, hydrodynamisme et marnage important, ..), se traduisent par une grande richesse spécifique en macroalgues. En effet, près de 700 espèces de macroalgues (dont 580 genres différents) ont été recensées sur le littoral breton (Dizerbo et Herpe, 2007).

I.3.2.2. Description des sites étudiés en Bretagne

Afin d'étudier les populations de Phéophycées des côtes bretonnes, quatre sites ont été sélectionnés sur le littoral finistérien et plus particulièrement à l'Ouest de Brest sur la commune de Plouzané (Figure I.12) : la Pointe du Diable (48°21'15''N ; 4°33'30''O), le Grand Dellec (48°21'6''N ; 4°34'12''O), le Minou (48°20'19''N ; 4°36'55''O) et la plage de Sainte Anne (48°21'42.72"N ; 4°33'13.69"O). Deux critères ont guidé la sélection de ces sites. Tout d'abord, la présence des 3 espèces recherchées et en second lieu la présence de biotopes différents de part la nature du substrat et le mode d'hydrodynamisme. Les trois sites échantillonnés dans le cadre de cette étude sont espacés d'environ 500 m. Protégés par la presqu'ile de Crozon, les sites du Minou et du Dellec sont caractérisés par un mode hydrodynamique protégé pour le premier et semi-exposé pour le second. Le site 3 est quant à

[2] Référence électronique indexée en fin de manuscrit

lui plutôt exposé aux forts courants caractérisant le goulet de Brest ainsi qu'aux houles d'Ouest à Sud-Ouest.

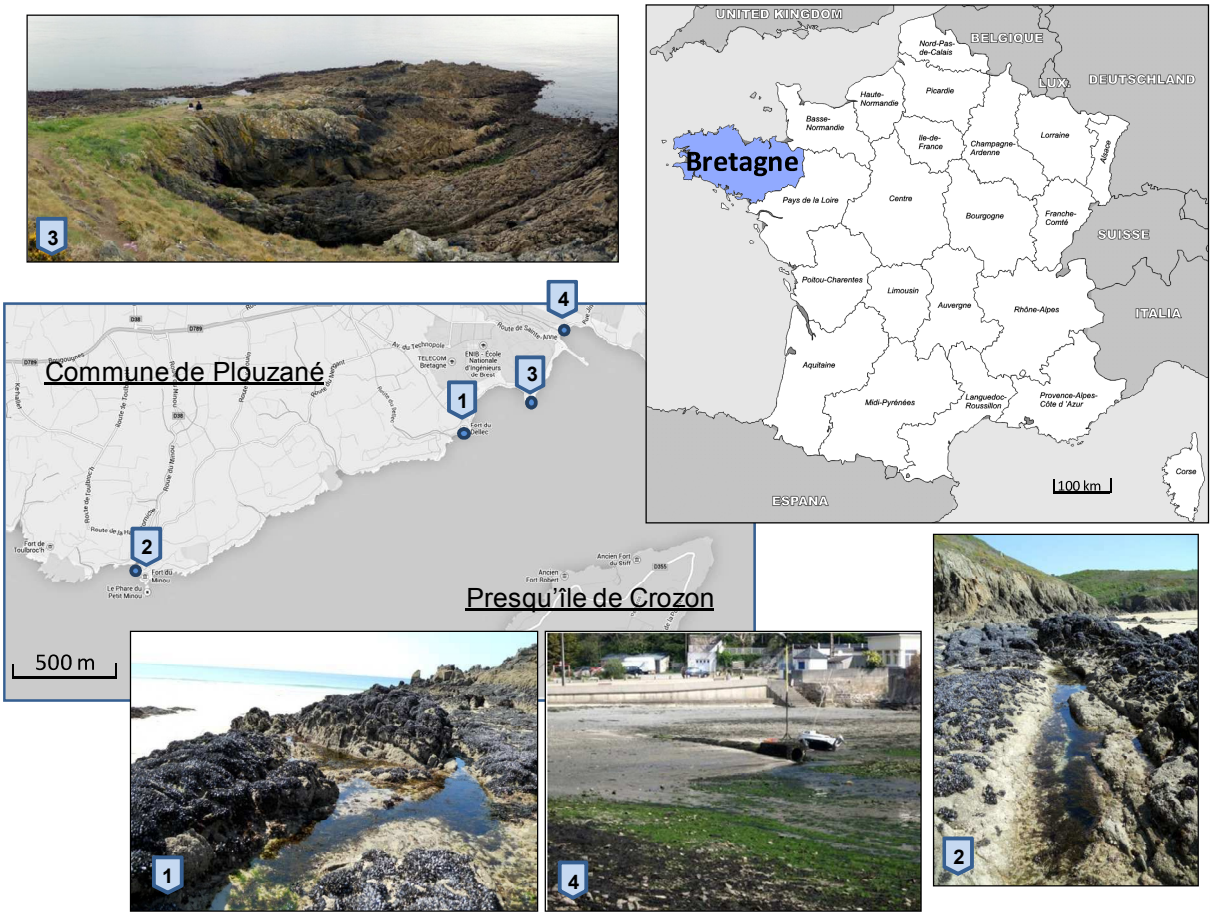


Figure I.12. Sites échantillonnés en France : 1-Le Grand Dellec; 2-Le Minou ; 3-La Pointe du Diable et 4-Plage de Sainte-Anne.

a) Site de La Pointe du Diable

Situé sur la commune de Plouzané (Finistère, Bretagne) (Figure I.13), le site de la Pointe du Diable est constitué de plusieurs mares découvertes à marée basse lors des marées de vives eaux. Le site d'étude principal est une mare découverte à marée basse de vives et moyennes eaux (coefficient de marée > 70) (Figure I.13 C). Cette mare, située à la base d'une falaise au niveau de la zone intertidale, est creusée dans la roche et son fond est constitué de débris rocheux de tailles diverses et de débris de coquillages. Ce site est exposé aux forts courants caractérisant le Goulet de Brest, ainsi qu'aux houles d'Ouest à Sud-Ouest. Une grande surface de l'estran rocheux est colonisée par des moules (*Mytilus edulis* Linnaeus). A noter, la présence, en bas de l'étage supralittoral et en haut du médiolittoral, du lichen *Lichina pygmea* (Lightfoot) Agardh, caractéristique des milieux battus. La profondeur de la mare atteint environ 80 cm au centre de la cuvette. Le bord le plus proche du littoral forme une

sorte de petite corniche (10 à 20 cm de large) où pousse essentiellement *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. D'autres espèces d'algues sont présentes, mais ne sont pas dominantes.

Figure I.13. A) Carte de localisation (zone entourée sur la carte) et vue d'ensemble du site de la Pointe du diable B) aperçu du site dans son ensemble ; C) de la mare principalement utilisée (entourée en rouge sur la photo).

b) Site du Dellec

Le site du Dellec et plus précisément du Grand Dellec (48°21'N, 4°34'O) est situé dans le goulet de la rade de Brest sur la commune de Plouzané (Finistère, Bretagne) (Figure I.14). C'est un site semi-abrité et l'estran est orienté Sud/Sud-Ouest. Sur ce site l'ensemble des ceintures de macroalgues brunes est présent. Cependant, une zone étendue, dénudée de toute macroalgue brune, est située entre la ceinture à *Fucus vesiculosus* et *Ascophyllum nodosum* et la ceinture à *Fucus serratus* (Connan, 2004).

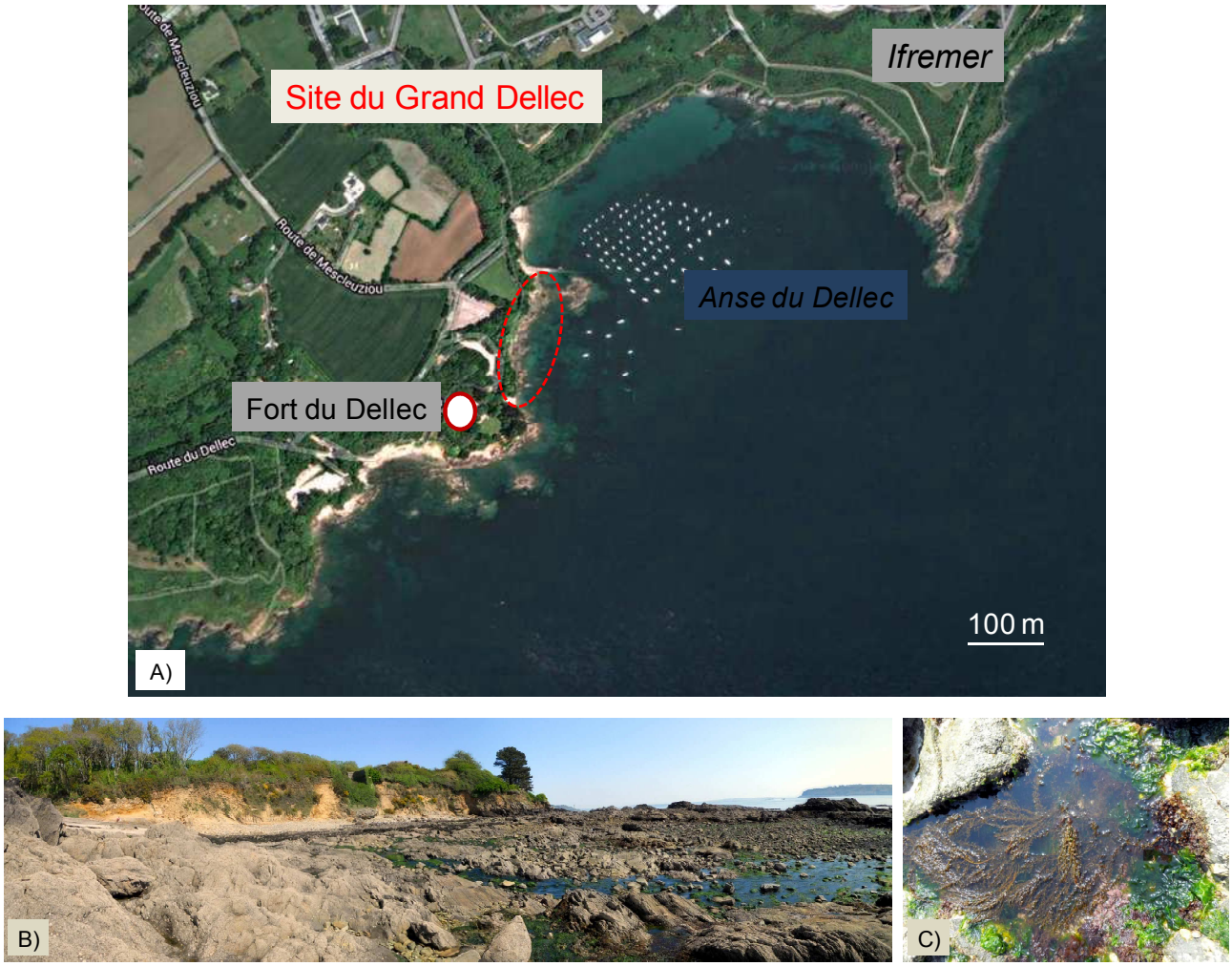


Figure I.14. A) Carte de localisation (zone entourée sur la carte) et vue d'ensemble du site du Dellec B) aperçu du site dans son ensemble ; C) détail d'une mare.

c) Site de la plage du Minou

La plage du Minou située sur la commune de Plouzané (Finistère, Bretagne) (48°20' N ; 4°36' O) (Figure I.15) ne se découvre vraiment qu'à marée basse. Il s'agit d'une zone sableuse entourée par des rochers. Ce site subit donc un hydrodynamisme faible à modéré ; on le considérera comme semi-abrité.

Figure I.15. A) Carte de localisation (zone entourée sur la carte) et vue d'ensemble du site de la plage du Minou B) aperçu du site dans son ensemble ; C) et D) détail de deux mares.

d) Site de Sainte Anne du Portzic

Le site de Sainte Anne est situé à la jonction des communes de Brest et de Plouzané (Finistère, Bretagne) (48°21' N ; 4°33' O). La plage de Sainte-Anne du Portzic était la seule plage naturellement sableuse de l'agglomération brestoise (Figure I.16).

Figure I.16. A) Carte de localisation (zone entourée sur la carte) et vue d'ensemble du site de Sainte-Anne B) La plage de Sainte-Anne-du-Portzic vue vers l'Ouest en décembre 2007; C) Avril 2007, embouchure du ruisseau busé sur la plage. Le sable au terme de la dérive est exporté vers le bas d'estran; D) Partie orientale de la plage de Sainte-Anne en 2008. D'après Fichaut et Suanez (2008).

Protégée par une jetée construite par Ifremer au début des années 70 ayant modifié l'hydrodynamisme de cette zone, la plage de Sainte-Anne est une zone relativement calme (Figure I.17). A la suite d'une série d'aménagements affectant le trait de côte et les abords de l'anse, la plage n'a cessé de perdre du sable et elle est aujourd'hui essentiellement caillouteuse (Fichaut et Suanez, 2008). À marée haute, seule la partie Sud-Ouest de la plage est hors d'eau et par fort coefficient seules quelques dizaines de mètres carrés d'estran restent émergés.

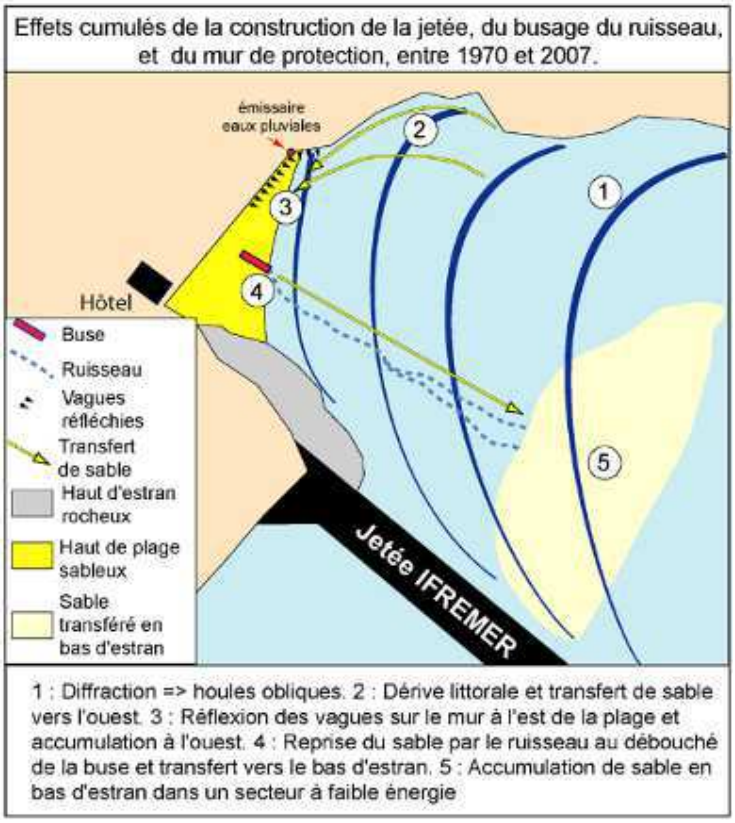


Figure I.17. Effets de la construction de la jetée « Ifremer » sur l'accumulation de sable dans l'anse de Ste Anne. D'après Fichaut et Suanez (2008).

I.3.3. Description de la côte atlantique et des pays étudiés en termes de couverture végétale et de climat

La troisième partie du manuscrit se réfère à une zone géographique que l'on peut désigner sous le terme d'Europe atlantique de par sa couverture végétale: ce terme géographique désignant la partie Ouest de l'Europe en bordure de l'océan Atlantique. Cette zone comprend au Nord : les îles britanniques (Royaume Uni, Irlande), l'Islande, la Belgique, les pays bas ainsi que la Scandinavie (Norvège, Suède et Danemark) et le Nord de l'Allemagne ; et au sud : le Portugal et les régions Nord de l'Espagne. Enfin, pour la France, elle concerne la partie Ouest en façade atlantique (Figure I.18 A). Les géographes classent, d'un point de vue strictement physique, cette zone biogéographique comme le Domaine Atlantique Européen, faisant partie de la région botanique Euro-sibérienne. Les conditions environnementales sont en général relativement semblables le long de cette zone (à l'exception de l'extrémité Nord), les paysages rencontrés abritent généralement des espèces animales et végétales communes. Cependant certaines disparités importantes sont visibles notamment au niveau de l'ensoleillement. Ainsi on peut tout de même citer des valeurs moyennes à l'année pour les durées d'ensoleillement : de 1200-1600 heures/an pour la Norvège, l'Irlande et la France ; 2000-2500 heures/an pour l'Espagne et >2500 heures/an pour le Portugal.

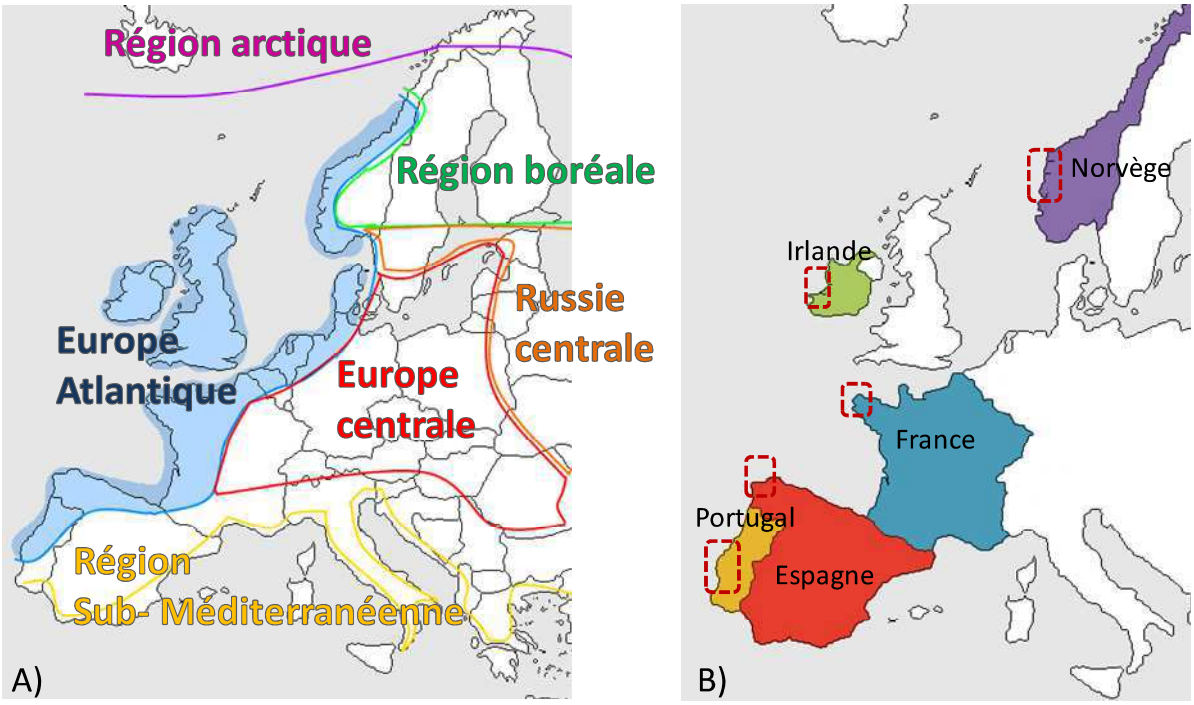


Figure I.18. A) Découpage de l'Europe en région d'un point de vue botanique (d'après Frey et Lösch, 2010) et B) localisation des cinq sites choisis sur les côtes atlantiques européennes.

Le long d'un gradient latitudinal Nord-Sud, des échantillons de *Sargassum muticum* ont été échantillonnés dans cinq pays : Norvège, Irlande, France, Espagne et Portugal.

Trois des cinq pays échantillonnés (Figure I.18 B), possèdent un climat océanique tempéré tandis les pays des extrémités Nord et Sud du gradient étudié connaissent des conditions climatiques extrêmes : climat de type Toundra ou océanique froid en Norvège et climat méditerranéen chaud au Portugal. Par ailleurs, le Portugal dans sa partie Sud n'est pas considéré comme faisant partie de l'Europe dite *« atlantique »*.

Les trois principaux climats rencontrés, d'après la classification de Peel *et al.* (2007) (*cf.* Figure I.19) peuvent être défini comme suit :

Climat océanique froid : La température moyenne dépasse rarement 10 °C. Les précipitations sont abondantes et réparties en toutes saisons avec un maximum en automne ou en hiver. Les tempêtes d'automne et d'hiver sont très fréquentes. Bien qu'agité, l'hiver reste « tempéré » par rapport à la latitude : on retrouve des températures comprises entre -3 et 4 °C pour le mois le plus froid. L'été reste frais avec une température moyenne de 12 °C.

Climat océanique tempéré : Il est caractérisé par une faible amplitude des températures entre l'hiver et l'été, le flux océanique modérant les températures. Dans cette zone les pluies sont fréquentes et régulières en toutes saisons avec un maximum en automne au Nord et en hiver au sud. Les tempêtes automnales et hivernales sont fréquentes. En hiver, par rapport à la latitude, le gel et la neige sont relativement rares et les températures moyennes sont comprises entre 2 et 10 °C. Les étés sont tempérés avec une température moyenne comprise entre 15 et 19 °C.

Climat méditerranéen : Il est caractérisé par une sécheresse estivale et un ensoleillement très importants. Les températures hivernales sont douces, surtout sur les côtes. L'été est chaud (jusqu'à 27 °C en moyenne en juillet au Sud). Dans les pays où règne ce climat, protégés du flux océanique humide par les montagnes et la latitude, les pluies rares se développent sur place. Ces perturbations sont peu nombreuses mais très irrégulières par rapport aux perturbations océaniques et les pluies engendrées sont parfois excessives. La pluviométrie annuelle des régions méditerranéennes est donc comparable à celle des climats précédemment décrits. Les pluies sont prédominantes au printemps et à l'automne dans le Nord et en hiver au Sud du domaine méditerranéen. L'été est assez sec surtout près des côtes et dans le sud. Le domaine méditerranéen peut être calme ou au contraire très venté (mistral, tramontane,…) suivant les effets d'abris ou de couloir induits par les reliefs environnants.

NB : Le domaine climatique auquel appartient la Galice (Espagne) reste une source de débats. Certains auteurs le rattachant au domaine océanique en raison d'étés modérément chauds quand d'autres le rattachent au climat méditerranéen par son ensoleillement élevé et la sécheresse y sévissant en été.

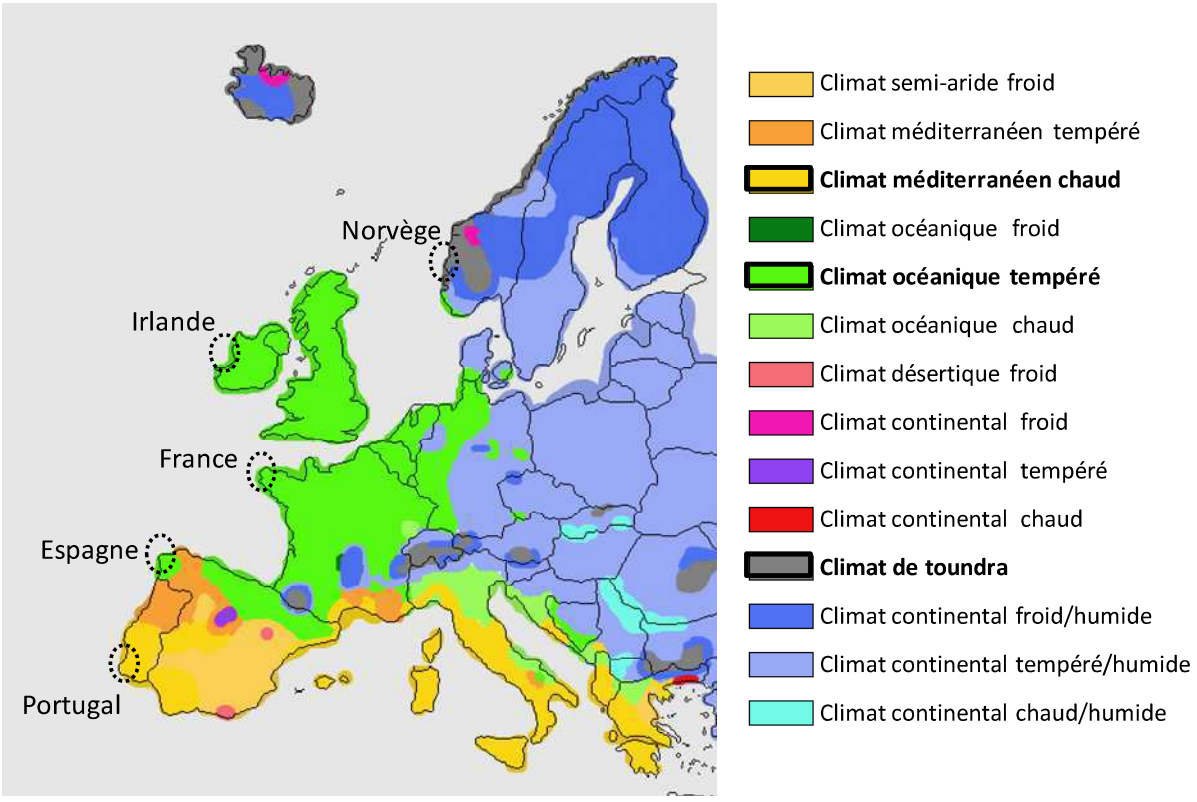


Figure I.19. Climat en Europe. D'après la classification de Peel et al. (2007).

Les différents pays et sites échantillonnés lors de cette étude en Europe Atlantique sont présentés ci-dessous. Les sites échantillonnés en France sont présentés plus haut (Paragraphe I.3.1.2).

I.3.4. Description des sites étudiés en Europe Atlantique

I.3.4.1. Sites échantillonnés en Norvège

Les sites échantillonnés en Norvège étaient situés dans les îles du Hordaland (Figure I.20). Le Hordaland, comté de la Norvège est situé au Sud-Ouest du pays et a une forme caractéristique en demi-cercle. Il est traversé par l'un des principaux fjords du pays : le long et profond Hardangerfjord. Øygarden est l'une des communes du comté de Hordaland. Elle est constituée d'une chaîne d'îles situées juste au Nord de la commune de Fjell. Le nom Øygarden provient des mots øy (« île ») et gard (« barrière ») : « barrière d'îles ». Les trois sites échantillonnés étaient : Solberg (60°35'15.96"N ; 4°47'51.57"O), Krækjebærholmen (60°35'0.32"N; 4°50'39.44"O) et Sauøyna (60°35'7.86"N; 4°50'52.70"O). Les deux premiers étant situés en façade Ouest de l'île (milieu battu) et le dernier plus protégé situé de l'autre côté (milieu abrité). Les trois sites sont assez rapprochés (moins de 5 Km entre eux) mais leur exposition aux courants étant différente cela permet tout de même une certaine hétérogénéité.

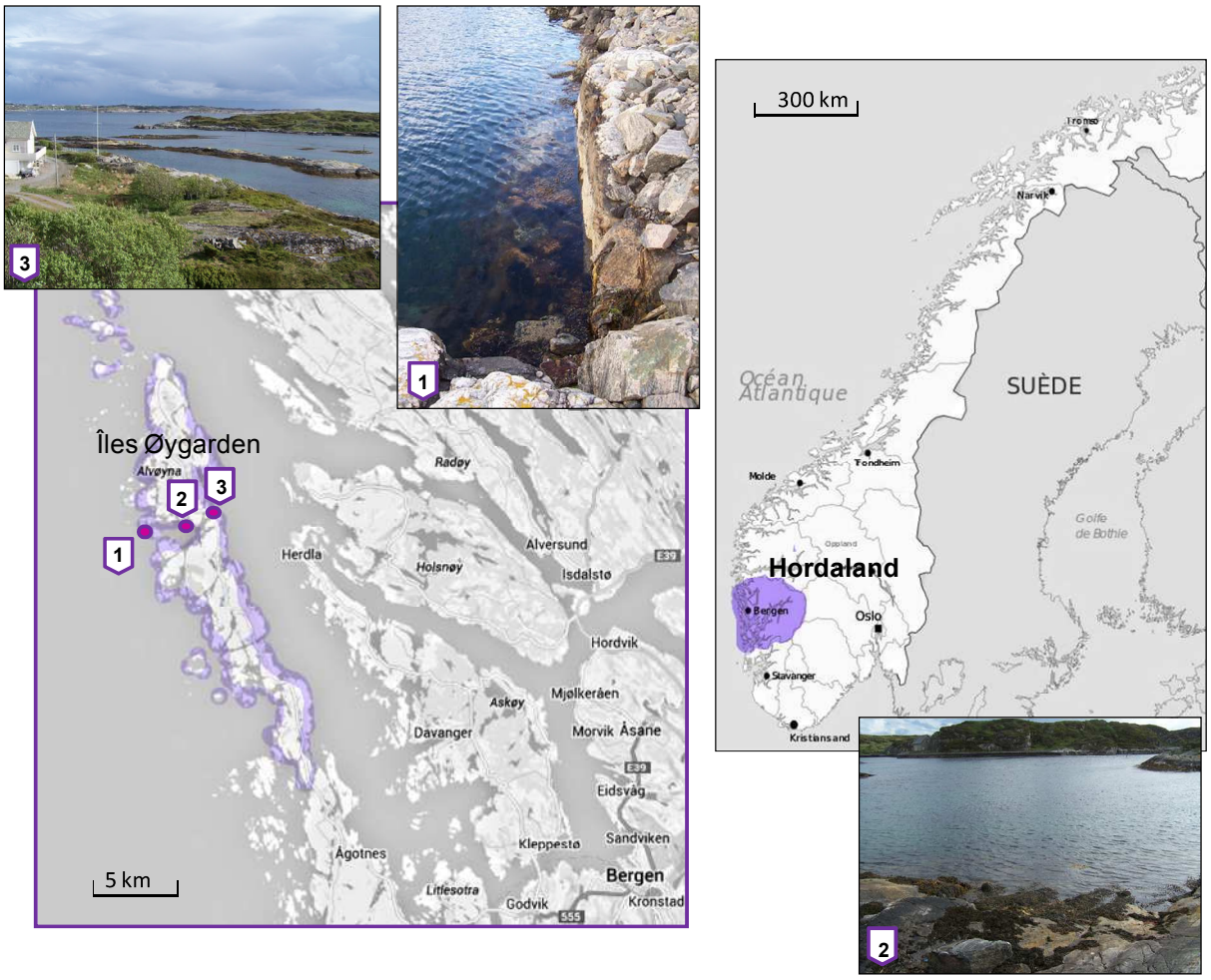


Figure I.20. Sites échantillonnés en Norvège : 1-Solberg; 2-Krækjebærholmen et 3-Sauøyna.

La présence des fjords dans cette zone va fortement influencer la salinité des eaux environnantes. En effet, les eaux y seront généralement saumâtres, résultat du mélange entre l'eau de mer salée et l'eau douce provenant des rivières, des cours d'eau souvent alimentés par

la fonte des neiges ou des glaciers. Cependant, la salinité et la température de ces deux eaux étant très différentes, elles se mélangent peu, l'eau douce restant en surface car moins dense que l'eau salée. Sur le littoral, le climat norvégien est plutôt tempéré, en particulier grâce à la chaleur apportée par le Gulf Stream et les pluies amenées par les vents d'Ouest. La Norvège, en raison de sa situation septentrionale particulière est soumise à des conditions de luminosité également très particulières : une partie du pays se trouve en effet au Nord du cercle polaire arctique, où le soleil ne se couche jamais en été (de mai à fin juillet) et ne se lève jamais en hiver (de fin novembre à fin janvier).

I.3.4.2. Sites échantillonnés en Irlande

L'Irlande est une ile située à l'Ouest de l'île de Grande-Bretagne, elle en est séparée par la mer d'Irlande à l'Est. Au Nord et Nord-Ouest elle est baignée par l'océan Atlantique et au Sud par la mer Celtique. Le climat de l'Irlande est tempéré (Figure I.19) et plus chaud que d'autres lieux situés à une même latitude, et ce, en raison de l'influence du Gulf Stream. Les vents dominants venant du Sud-Ouest apportent d'importantes pluies sur la partie Ouest de l'île. La pluviométrie est la plus importante entre les mois d'août et de janvier où elle représente 60% de la pluviométrie annuelle. Les mois de janvier et février sont les mois les plus froids de l'année avec une température moyenne de 4 à 7 °C. Juillet et août sont les plus chauds avec une fourchette de température comprise entre 14 et 16 °C. L'ensoleillement maximal a lieu pendant les mois de mai et de juin, avec une moyenne de cinq à sept heures d'ensoleillement par jour. De fortes dépressions atlantiques peuvent survenir au cours de l'hiver avec des vents pouvant atteindre des vitesses de l'ordre de 160 km/h. Durant l'été, surtout fin juillet et début août, des orages violents peuvent survenir, surtout dans les Midlands et dans les régions présentes à l'Ouest du pays.

L'échantillonnage a été mené à l'Ouest de l'île, en baie de Galway (Figure I.21). Il s'agit d'une grande baie située sur la côte Ouest de l'Irlande, entre le comté de Galway au Nord et le comté de Clare au sud. La ville de Galway est située au Nord-est de cette baie. Il existe de nombreuses îles dans cette baie, notamment les Îles d'Aran situées à l'Ouest pouvant protéger une partie de la côte Ouest de la houle et d'un trop fort hydrodynamisme. Ainsi les sites de Miltown Malbay (52°50'52''N ; 9°26'46''O) et de Spanish Point (52°51'9''N ; 9°26'33''O) sont en mode semi-abrité comparé à celui de Clifden (53°24'18''N ; 10°7'4'' O), plus au Nord, que l'on considérera de mode battu. Les sites 2 et 3 sont assez proches (moins de 5 Km) alors que le site 1 se trouve à environ 100 Km de ces deux points.

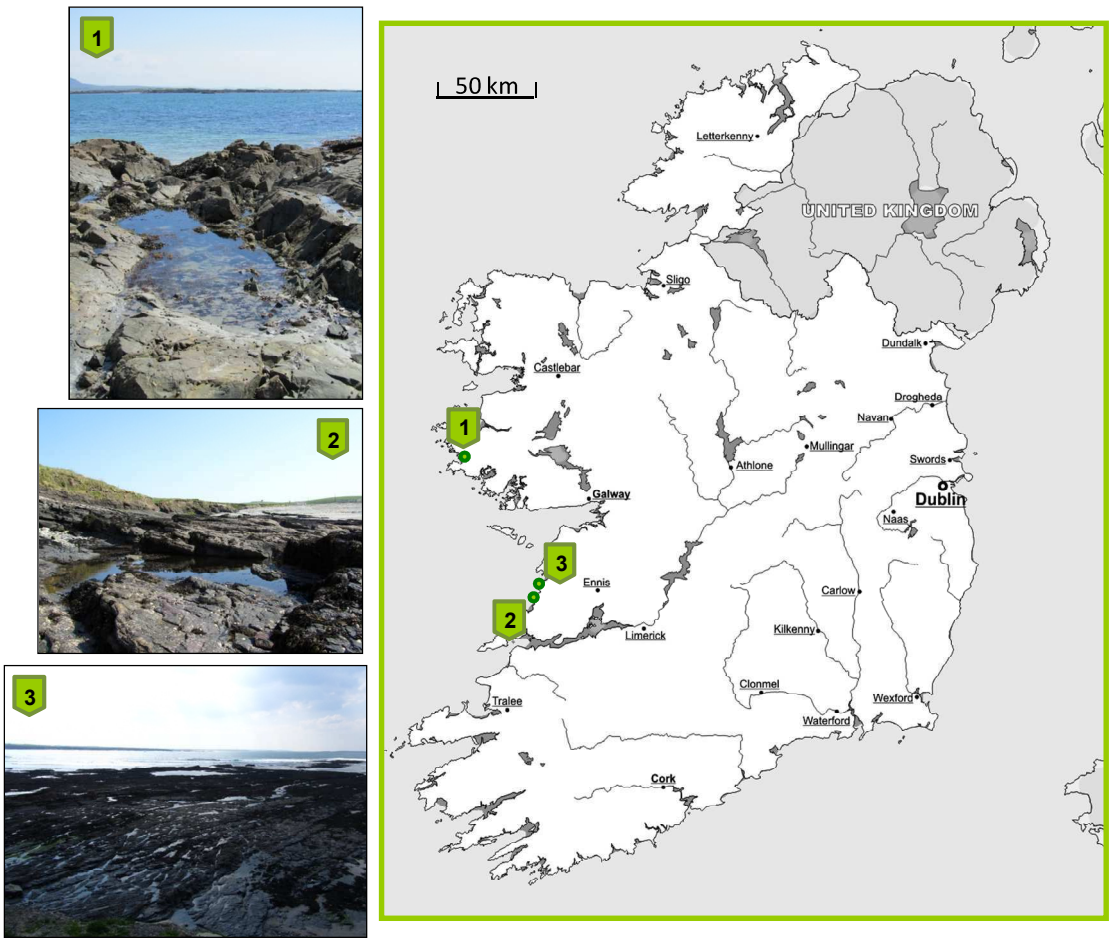


Figure I.21. Sites échantillonnés en Irlande : 1-Clifden; 2-Miltown Malbay et 3-Spanish Point

I.3.4.3. Sites échantillonnés en Espagne

Les échantillonnages menés en Espagne ont été effectués en Galice (Figure I.22). Cette région est située à l'extrémité Nord-Ouest de l'Espagne. Elle est entourée par la principauté des Asturies, la Castille-et-León, le Portugal, l'océan Atlantique et la mer Cantabrique. Malgré sa superficie limitée, la Galice compte trois zones climatiques relativement tranchées. A l'Ouest de cette zone, les températures sont douces (moyenne 14 °C), sans grandes variations entre le minimum et le maximum saisonniers. La pluie tombe en moyenne 1 000 millimètres/an. Dans cette zone on compte plus de deux mille heures de soleil par an.

Les trois sites échantillonnés : Museo del Mar (42°13'23.95"N ; 8°46'21.82"O), Cabo Estai (42°11'21.99"N ; 8°48'47.35"O) et Cabo Udra (42°20'12.50"N ; 8°50'4.03"O) sont situés dans un rayon de moins de 20 Km. Le site 1 : Museo del Mar est de mode semi-exposé car protégé par les îles Cíes à l'Ouest. Les îles Cíes sont situées dans la Ria de Vigo et forment une barrière naturelle entre la ria et l'océan. De plus, ce site est très proche d'une zone fortement anthropisée au niveau de la ria de Vigo (port de plaisance). Les deux autres sites sont de mode battu car davantage soumis à l'hydrodynamisme.

Figure I.22. Sites échantillonnés en Espagne : 1-Museo del Mar; 2-Cabo Estai et 3-Cabo Udra.

I.3.4.4. Sites échantillonnés au Portugal

Le climat du Portugal est de type méditerranéen selon la classification de Köppen (*cf.* figure I.19). D'après cette classification, le climat est caractérisé essentiellement par des étés chauds et secs et des hivers assez doux. En hiver, les mois les plus froids sont janvier et février, mais les températures restent douces. Des vagues de froid surviennent périodiquement comme on peut le voir également dans les régions méditerranéennes. En été, les mois les plus chauds et les plus secs sont juillet et août, avec une température moyenne supérieure à 20 °C et pouvant atteindre plus de 45 °C par pics dans certaines régions. Contrairement à la moitié Nord du pays où le climat est classé « Csb » (Climat méditerranéen tempéré) ; sur la moitié Sud du Pays, là où ont été effectués les échantillonnages, le climat est plutôt méditerranéen chaud (« Csa ») : caractérisé par des étés très chauds et secs, et des hivers doux : c'est le climat méditerranéen-type. La neige et les gelées sont rares et l'ensoleillement est souvent supérieur à 2 500 heures/an.

Les sites : Queimado (37º49'39" N ; 8º47'27" O), Almograve (37º39'11" N ; 8º48'08" O) et Zambujeira (37º33'00" N ; 8º47'36" O), sont espacés de moins de 20 Km et sont tous caractérisés par un mode d'hydrodynamisme semi-battu en raison de leur exposition moins importante aux courants Atlantiques (Figure 1.23).

Figure I. 23. Sites échantillonnés au Portugal : 1-Queimado; 2-Almograve et 3-Zambujeira.

Les algues utilisées pour cette étude ont été récoltées durant le printemps 2011 le long des côtes Européennes. Afin d'utiliser *S.muticum* dans un même état physiologique (thalles immatures), la période d'échantillonnage a été adaptée au pays concerné (Tableau I.1). Ainsi, comme vu plus haut *Sargassum muticum* a été récoltée en mars-avril dans le sud de l'Europe (Portugal-Espagne) et en France-Irlande et en mai en Norvège. Un résumé des localités de chacun des sites ainsi que leur mode d'exposition est présenté dans le Tableau I.1 :

Tableau I. 1. Localisation et mode d'hydrodynamisme des différents sites échantillonnés dans le cas de l'étude de *Sargassum muticum* le long du gradient latitudinal.

PAYS	REGION	DATES RECOLTE	LOCALITE	SITE	LATITUDE	LONGITUDE	EXPOSITION
Norvège	Øygarden	17/05/2011	Solberg	1	60°35' N	4°47' W	Abrité
	Øygarden	17/05/2011	Kræjebæbærholmen	2	60°35' N	4°50' W	Semi-battu
	Øygarden	17/05/2011	Sauøyna	3	60°35' N	4°51' W	Semi-battu
Irlande	Connaught	17/04/2011	Clifden	1	53°24' N	10°7' W	Battu
	Munster	18/04/2011	Spanish Point	3	52°51' N	9°26' W	Semi-battu
	Munster	18/04/2011	Miltown Malbay	2	52°50' N	9°26' W	Semi-battu
France	Bretagne	18/04/2011	Grand Dellec	1	48°21' N	4°34' W	Abrité
	Bretagne	18/04/2011	Le Minou	2	48°20' N	4°36' W	Semi-battu
	Bretagne	18/04/2011	Point du Diable	3	48°21' N	4°33' W	Battu
Espagne	Galicia	18/03/2011	Museo del mar	1	42°13' N	8°46' W	Semi-battu
	Galicia	18/03/2011	Cabo estai	2	42°11' N	8°48' W	Battu
	Galicia	21/03/2011	Cabo udra	3	42°20' N	8°49' W	Battu
Portugal	Algarve	01/04/2011	Queimado	1	37°49' N	8°47' W	Semi-battu
	Algarve	01/04/2011	Almograve	2	37°39' N	8°48' W	Semi-battu
	Algarve	01/04/2011	Zambujeira	3	37°33' N	8°47' W	Semi-battu

Ces sites aux profils très différents sont soumis également aux caprices du milieu. Les paramètres principaux mesurés dans le but de définir un milieu environnemental donné sont définis ci-dessous.

I.4. Variabilité des paramètres du milieu et incidence sur les teneurs en biomolécules

L'environnement marin est caractérisé par une grande hétérogénéité des paramètres physico-chimiques le définissant. Son état va évoluer au gré des fluctuations naturelles et/ou antropiques jouant sur l'intensité lumineuse, la température, le pH et la salinité de l'eau, la disponibilité en nutriments, la présence de polluants ou encore les interactions biotiques. Il faut ensuite différencier les variations au sein de l'individu lui-même (entre les différentes parties du thalle par exemple) (Stengel et Dring, 1998 ; Connan *et al*., 2006), des variations temporelles pouvant intervenir à différentes échelles (de la minute à la saison) (Stengel *et al*., 2011) et des variations environnementales faisant intervenir différents paramètres du milieu. Ce paragraphe décrit les différents paramètres du milieu pouvant impacter les teneurs en biomolécules chez les algues. A la fin de ce paragraphe sera résumée, d'après les données présentées dans la littérature, l'étude de la variabilité des différents compartiments biochimiques en fonction des paramètres environnementaux.

I.4.1. Descriptions des paramètres du milieu

I.4.1.1. Température

La température de surface de la mer est un paramètre influant grandement sur la distribution géographique des algues. C'est au niveau de la fine couche en surface de la mer que se produisent les interactions entre l'océan et l'atmosphère qui gouvernent le climat. Elle a donc une grande influence sur le type et la quantité d'organismes vivants dans les profondeurs de la mer. Cette température varie suivant les saisons et les années en fonction des différents courants marins, de la température extérieure,… Elle a une incidence sur les organismes vivant dans ces eaux et donc sur les algues même si, dans notre cas, *S.muticum* étant plutôt récoltée dans les mares, la température de l'eau dans celle-ci sera davantage dépendante du rayonnement solaire que de la température en pleine mer.

Peu d'études ont démontré un impact direct de ce facteur sur la composition des macroalgues. En effet, les changements de température induisent souvent des changements physiologiques au niveau de l'assimilation du carbone et de l'absorption des nutriments. La sensibilité à la température va dépendre de la saison, de l'établissement géographique de l'espèce,.. Les réponses aux fluctuations de température varient énormément suivant qu'il s'agisse d'une acclimatation de l'algue sur le court terme ou d'une réelle adaptation sur le long terme. Le stress engendré par une température trop importante produit grossièrement les même effets qu'un autre stress et conduit à la production de métabolites de stress et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Collen et Davison, 2001 ; Dring, 2006) par les algues ; et peut donc, augmenter l'effet d'autres stress tels que ceux causés par des variations de salinité ou de luminosité (Sampath-Wiley *et al*., 2008 ; Davison, 1987 ; Rautenberger et Bischof, 2006). On

sait également que la quantité de glucides et de protéines dépend de la température de l'eau (Banerjee *et al*., 2009). De même, la quantité de composés phénoliques (CP) diminue dans les algues, celles-ci ayant tendance à les exsuder dans le milieu en réponse à de fortes températures (Phillips et Towers, 1982). Par ailleurs, Hwang *et al.* (2004) ont rapporté une influence de la température de l'eau sur la croissance de *S. muticum*.

I.4.1.2. Hydrodynamisme

La notion d'hydrodynamisme regroupe l'ensemble des caractéristiques liées aux mouvements de l'eau. Selon le lieu, il varie en fonction de la marée et des vents mais aussi de la profondeur et de la forme du littoral. Des modifications dans l'étagement de l'ensemble des espèces végétales et animales sont alors visibles (Figure I.24). On distinguera 3 modes d'hydrodynamisme différents selon l'exposition du site à la houle et aux vagues: le mode abrité, le mode battu (ou exposé), et un mode intermédiaire semi-battu (ou semi-abrité). Le mode abrité correspond généralement à un site côtier plutôt protégé souvent situé en fond de baie ou protégé par une barrière rocheuse. Le mode battu est au contraire rencontré au niveau des pointes rocheuses et/ou exposé aux vents dominants. L'action mécanique de l'hydrodynamisme peut avoir un grand impact sur les macroalgues, qui peuvent être endommagées (abrasion, décrochage, ..), subir des modifications morphologiques et/ou physiologiques impactant leur taille (Villalard-Bohnsack et Harlin, 2001) ou encore leur activité photosynthétique (Hurd, 2000). Pour les algues non encroûtantes vivant en mode battu, une bonne fixation au substrat est donc une nécessité de survie.

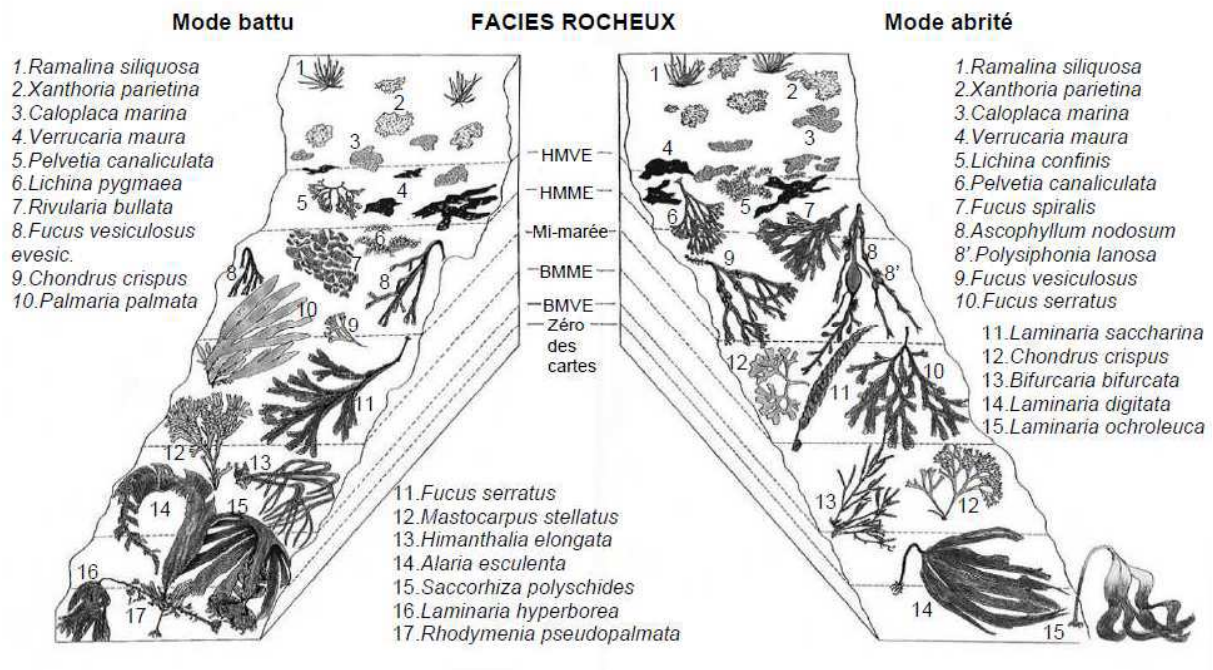


Figure I.24. Diagramme de l'étagement vertical de la végétation marine en zone tempérée du Nord-Est Atlantique. HMVE : niveau moyen des hautes mers de vive eau ; HMME : niveau moyen des hautes mers de morte eau ; BMME : niveau moyen des basses mers de morte eau, BMVE : niveau moyen des basses mers de vive eau ; Zéro des cartes : niveau des plus basses mers (Floch, 1964, modifié dans Cabioc'h *et al.*, 2006).

Les individus provenant de sites abrités sont souvent de taille plus importante que ceux subissant un fort hydrodynamisme (Villalard-Bohnsack et Harlin, 2001 ; Stiger et Payri, 1999a). De nombreuses études font référence à l'effet négatif d'un fort hydrodynamisme sur la croissance des thalles (Gaylord *et al.,* 1994 ; Viejo *et al.,* 1995). Le Lann *et al.* (2012a) l'ont d'ailleurs montré chez *Sargassum muticum*, par comparaison d'individus provenant de sites exposés ou de sites abrités. Les latérales des individus vivant en site battu étaient déchirées par les vagues et/ou la houle. Un hydrodynamisme important peut également être un frein à l'installation de jeunes plantules. En revanche, les études menées par Plouguerné *et al.* (2006) ainsi que de nombreux autres auteurs (Van den Hoeck, 1978 ; Hay, 1981 ; De Paula et de Oliveira, 1982 ; Ang, 1986 ; Stiger et Payri, 1999a,b) ont montré une variabilité spatiale de la densité d'espèces de *Sargassum* démontrant l'influence positive exercée par l'hydrodynamisme.

Les conséquences physico-chimiques d'un fort hydrodynamisme au niveau des côtes sont nombreuses : plus d'oxygène, meilleure diffusion des éléments nutritifs et échanges thermiques plus intenses par rapport aux eaux du large soumises à une agitation moins importante par exemple. Les configurations sont très variées : dans certaines zones les eaux se renouvellent très bien ; *a contrario* dans d'autres, comme les baies, des tourbillons piègent les masses d'eaux et empêchent leur renouvellement. Certains secteurs se réchauffent davantage et plus rapidement. Ce sont en général des zones peu profondes et/ou à courant faible. Les secteurs plus confinés vont être plus sensibles écologiquement parlant. Localement, la combinaison de la température, de la marée, des courants, de la forme et de la profondeur du littoral a des conséquences sur le confinement ou non des masses d'eaux. Ce confinement rend certaines zones côtières écologiquement plus vulnérables aux activités anthropiques (accumulation d'éléments nutritifs, contamination microbienne ou chimique), les polluants d'origine continentale étant dispersés plus rapidement grâce à un fort hydrodynamisme. L'azote et le phosphore, apportés par les rivières, créent également des déséquilibres lorsqu'ils sont présents en trop grande quantité dans les eaux littorales.

I.4.1.3. Luminosité

Le rayonnement photosynthétiquement actif (RPA, ou PAR de l'anglais « Photosynthetically Active Radiation ») est un rayonnement utilisé par les algues lors de la photosynthèse, dont les longueurs d'onde s'étendent de 400 à 700 nm. L'énergie lumineuse reçue par la surface éclairée s'exprime en $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, en $Einstein.m^{-2}.jour^{-1}$ ou en $Einstein.m^{-2}.s^{-1}$. Celle-ci varie énormément au cours de l'année. Le développement des macroalgues est déterminé par la présence de lumière propice (qualitativement et quantitativement) à leur développement. La luminosité ambiante influe sur le métabolisme énergétique et sur la productivité des algues, celles-ci vont donc s'adapter suivant les conditions de lumière. La lumière pouvant varier au gré des heures, des jours, des saisons, des années,… son influence pourra être ressentie par les algues à différentes échelles (Kübler et Raven, 1996). Bien évidemment, en premier lieu la luminosité va jouer sur l'activité photosynthétique et donc sur la pigmentation des algues (Rammus *et al*., 1976, 1977). Elle va également jouer sur d'autres compartiments du métabolome en influençant par exemple la quantité de lipides, protéines et

carbohydrates. La quantité de composés phénolique va diminuer dans les thalles en réponse à une trop forte intensité lumineuse, ceux-ci vont être exsudés dans le milieu, ce système devant fournir une photoprotection supplémentaire (Swanson et Druehl, 2002). L'accès à la lumière va également dépendre de la profondeur de l'eau (Figure I.25) ou de la position sur l'estran (Häder et Figueroa, 1997). En effet, les radiations lumineuses qui atteignent la surface de l'eau de mer sont filtrées de façon différentielle au travers de la colonne d'eau, suivant la longueur d'onde considérée (Figure I.25).

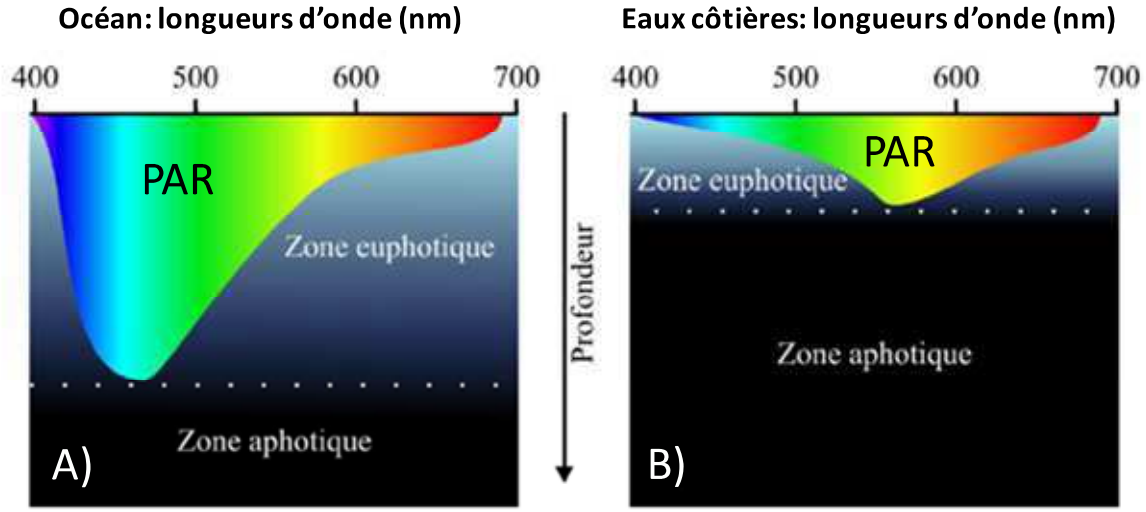


Figure I.25. Atténuation du spectre lumineux en fonction de la profondeur, A) dans les océans et B) dans les eaux proches du trait de côte (d'après Kyle Carothers, données NOAA-OE). Sur les graphiques, la gamme de couleurs à une hauteur donnée signifie l'étendue du spectre de lumière disponible à la profondeur correspondante. D'après Jégou (2011).

En effet, la mer recouvre plus longtemps les niveaux bas, or la colonne d'eau constitue un filtre naturel pour les radiations lumineuses, notamment les ultraviolets. En effet, lors d'expérimentations réalisées *in situ* il a été mis en évidence que les algues brunes augmentaient leurs proportions en fucoxanthine et en chlorophylle *c* avec la profondeur, c'est-à-dire en cas de faible lumière (Lüning, 1990 ; De Reviers, 2003a). Jégou (2011) a montré que l'influence de la luminosité a peu d'impact sur les algues vivant dans les cuvettes, et ce, même en haut de l'estran. A l'inverse, des espèces vivant dans des zones émergées à marée basse seraient donc protégées face à des excès de lumière.

I.4.1.4. Salinité

L'influence de la salinité sur les macroalgues brunes n'est pas très étudiée. En effet, la majorité des études se concentrent sur la production de composés osmorégulateurs en cas de stress salin mais ne s'intéressent pas vraiment aux autres composés pouvant subir des variations (Kirst, 1989 ; Karsten *et al*., 1997 ; Gylle *et al*., 2009). Bäck *et al.* (1992) ont montré, par exemple que le genre *Fucus* était capable de produire davantage de mannitol en réponse à un stress salin. Par ailleurs, les stress salins (excès ou manque) conduisent à un stress oxydatif chez l'algue et donc à la production de composés anti-oxydants tels que des composés phénoliques, enzymes, acides gras,.. (Kumar *et al*., 2010). Ainsi, chez les algues

brunes une corrélation négative a été trouvée entre le niveau de salinité et les teneurs en CP et protéines mesurées chez les algues. On retrouve la même corrélation entre le niveau de salinité et la longueur des thalles (Pedersen, 1984 ; Marinho-Soriano *et al.,* 2006 ; Plouguerné,2006 ; Connan et Stengel, 2011a,b).

I.4.1.5. Nutriments

Parmi les substances indispensables aux algues, on retrouve le carbone inorganique utilisé pour la photosynthèse et le dioxygène pour la respiration. D'autres sources de nutriments sont également utilisées par les algues. L'azote sous forme d'ion ammonium, de nitrite ou de nitrates va pouvoir leur fournir le substrat pour la fabrication de protéines, nucléotides, par exemple. Une source de phosphore est requise, en particulier pour la synthèse de l'ATP et des acides nucléiques. Certains métaux tels que le magnésium, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène sont nécessaires, en particulier pour la chlorophylle (le magnésium) et certains cofacteurs enzymatiques. Un nutriment peut s'avérer limitant à des quantités très variables selon les espèces et les besoins diffèrent aussi qualitativement d'un taxon à l'autre. Par exemple, l'azote est souvent un facteur limitant à la croissance des algues comme en témoigne son apport souvent indispensable en aquaculture. A l'inverse, dans un environnement riche en azote l'algue est capable d'accumuler des acides aminés et des protéines pour former des réserves en azote. Lorsque les conditions le rendent nécessaire, en cas de limitation en lumière par exemple, les algues peuvent utiliser les réserves qu'elles stockent sous différentes formes (hydrates de carbone, hétérosides, lipides). L'absorption des nutriments est influencée par les facteurs de l'environnement (lumière, température, hydrodynamisme) et l'état physiologique de l'algue (croissance, morphe, dormance, efflorescence, etc). Par ailleurs, un apport de substances dissoutes résultant d'une pollution anthropique par exemple peut être nuisible, voire létal pour les algues ou, au contraire, selon les espèces, profitable.

En résumé…

NB : Attention aux effets croisés ! La revue de Stengel *et al*. (2011) souligne un point important à prendre en compte avant de se lancer dans l'étude de l'effet d'un ou plusieurs paramètres du milieu sur le métabolome : les interactions entre les différents paramètres du milieu qui peuvent augmenter ou diminuer l'effet d'un paramètre en particulier. Par exemple : les impacts de la salinité et de l'irradiance sont augmentés en cas de températures extrêmes (Rautenberg et Bischof, 2006).

Devant la complexité des relations entre facteurs abiotiques et teneurs en macromolécules chez les macroalgues, il est important de ne pas tirer de conclusions générales devant l'observation d'une tendance ponctuelle. Le Tableau I.2 ci-dessous reprend, de manière résumée les principales observations retrouvées dans la littérature. Pour plus de précisions, la synthèse de Stengel *et al.,* 2011 est particulièrement bien renseignée. On remarque le manque d'informations concernant certain compartiments (lipidique par exemple) sur lesquels seulement une ou deux études se sont attardées. Les effets d'un paramètre en particulier étant difficiles à discerner en milieu naturel, de nombreux auteurs préfèrent étudier

les variations sur une échelle plutôt temporelle et tirent des conclusions quant à l'évolution saisonnière ou journalière des différents compartiments. Ces conclusions sont souvent plus justes, les différents facteurs du milieu pouvant interagir entre eux rendant des études plus précises très délicates dans leur interprétation.

Tableau I.2. Variabilité des différents compartiments étudiés en fonction des paramètres environnementaux d'après les données présentées dans la littérature.

		Facteurs étudiés							
		Salinité		Lumière		Température		Nutriments	
Compartiment	**Composés phénoliques**	-	Ragan et Glombitza, 1986; Pedersen, 1984; Connan et Stengel, 2011	+	De la Coba *et al*., 2009; Pavia *et al*., 1997	-	Phillips et Towers, 1982	-	Pavia et Toth 2000; Arnold *et al.* , 1995; Koivikko *et al.* , 2005
	Lipides	-	Banerjee *et al*., 2009	*n.r.*		-	Banerjee *et al.*, 2009	+	Banerjee *et al*., 2009
	SFA	*n.r.*		*n.r.*		+	Kumari *et al*., 2009	*n.r.*	
	PUFA	*n.r.*		-	Sukenik *et al.*, 1989; Napolitano, 1994	-	Kumari *et al*., 2009	*n.r.*	
	Protéines	-	Marinho-Soriano *et al*., 2006; Banerjee *et al.*, 2009	-	Durako et Dawes, 1980	-	Banerjee *et al*., 2009; Durako et Dawes, 1980	+	Banerjee *et al*., 2009
	Carbohydrates	+	Bäck *et al*., 1992	+/-	Durako et Dawes, 1980; Henley, 1990; Torres *et al*., 1995	+	Durako et Dawes, 1980; Banerjee *et al*., 2009	-	Banerjee *et al*., 2009
	Pigments	*n.r.*		+/-	Ramus *et al*., 1976, 1977; Ensminger *et al.*, 2005	*n.r.*		+	Henley et Dunton, 1997
	Zéaxanthine	*n.r.*		+	Ruban *et al*., 2007; Goss et Jakob, 2010	*n.r.*		*n.r.*	
	Violaxanthine	*n.r.*		-	Ruban *et al*., 2007; Goss et Jakob, 2010	*n.r.*		*n.r.*	

n.r., non renseigné ; +, corrélation positive ; -, corrélation négative ; +/-, effet positif ou négatif : met en jeu d'autres paramètres

I.4.2. Mesure des paramètres environnementaux

Les paramètres environnementaux dans les 5 pays échantillonnés ont été obtenus à partir des données fournies par deux des satellites développés par la NASA : SAC-D et Aqua (EOS PM-1) [2][3]. Ainsi, nous avons pu avoir accès aux différents paramètres tels que la salinité, la température de l'eau, les radiations (PAR) ainsi que la concentration en carbone organique dissous. Les figures I.26, I.27 retracent la variabilité des paramètres environnementaux température de l'eau de mer, rayonnement PAR, carbone inorganique particulaire et salinité, estimés au niveau des eaux en bordures des côtes européennes et pour les mois où *Sargassum muticum* a été récoltée. Les données se présentent sous forme d'une échelle de couleur. Pour la suite des analyses, notamment les analyses statistiques des données et leur corrélation possible avec un paramètre environnemental, il a été indispensable d'attribuer une valeur numérique à chacun des paramètres (Tableau I.3).

[3] Référence électronique indexée en fin de manuscrit

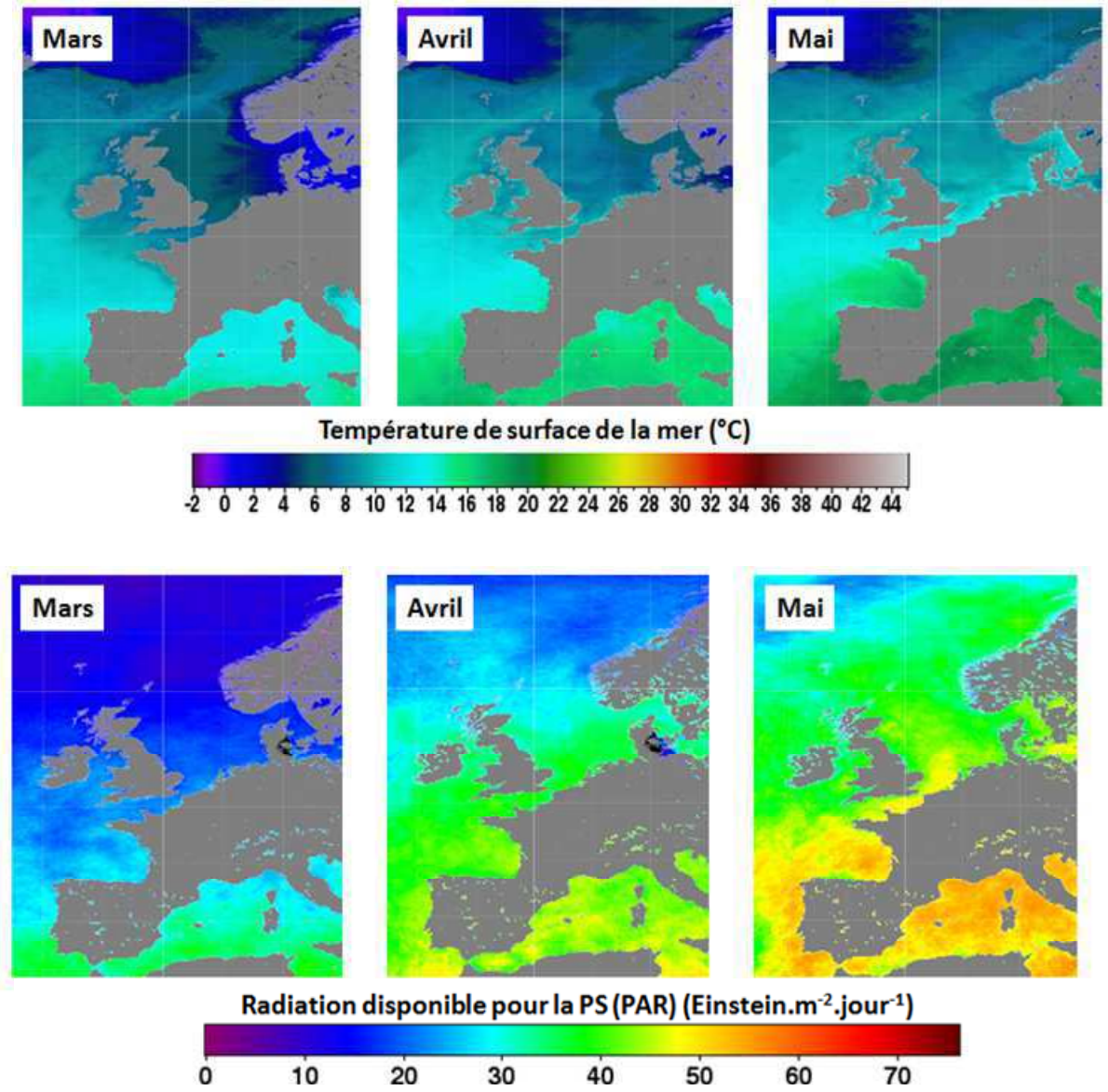


Figure I.26. Température moyenne de surface de l'eau (A) et rayonnement PAR moyen disponible pour la photosynthèse (B) dans les eaux européennes pour les mois de mars, avril et mai 2011 (d'après les données du satellite Aqua (EOS PM-1) MODIS).

Les paramètres tels que la concentration en Carbone inorganique particulaire dissous, la température de surface de l'eau ainsi que la quantité de radiations PAR reçue sont fournit par le satellite Aqua (EOS PM-1) de la NASA grâce à l'instrument embarqué MODIS (de l'anglais : *Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer)* [2][4]. Les données sont acquises tous les deux jours sur toute la surface du globe, puis ensuite moyennées par mois ce qui a permis de construire les cartes en Figures I.26 et I.27. Pour chacun des paramètres, nous avons choisis de présenter les données correspondant à la période d'échantillonnage : de mars à mai 2011.

[4] Référence électronique indexée en fin de manuscrit

La salinité a quant à elle été mesurée par le satellite argentin destiné à l'étude de la Terre : SAC-D aussi appelé *Aquarius* du nom du principal instrument embarqué, utilisé principalement pour les mesures de salinité des eaux de surface des océans. Les données fournies par ce satellite n'étant pas très nettes (résolution assez faible de l'image) nous nous sommes aidés d'une carte fournie par le World Ocean Atlas 2001 sur le site de la NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) [3][5] sur laquelle sont présentées les mesures de salinité moyenne sur une année en Europe (Figure I.27 A).

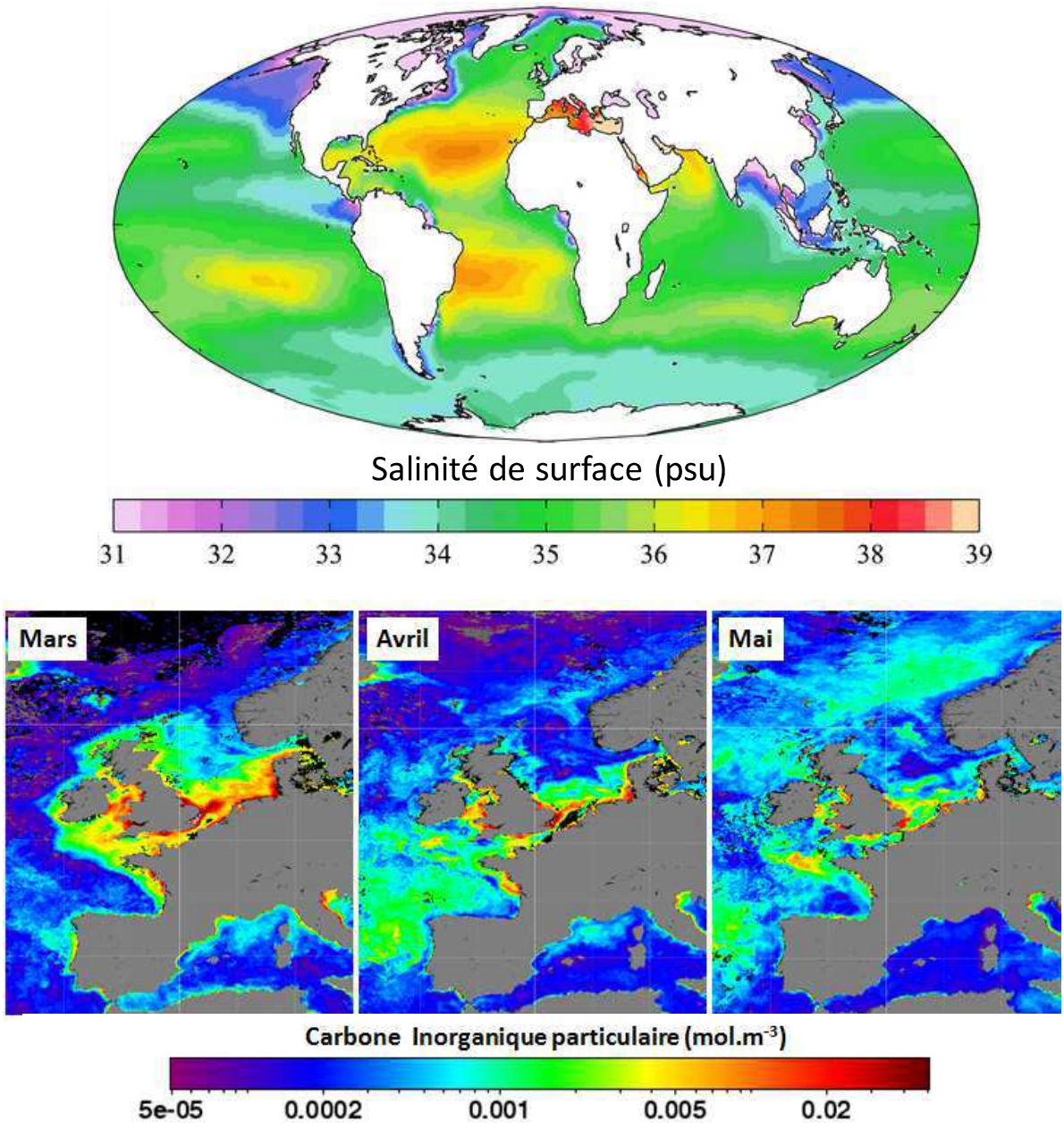


Figure I.27. Salinité moyenne de l'eau de mer de surface sur le globe pour l'année 2011 (A) et Carbone inorganique dissous (B) dans les eaux européennes pour les mois de mars, avril et mai 2011 (d'après les données du satellite *Aquarius*).

[5] Référence électronique indexée en fin de manuscrit

Les valeurs des paramètres obtenues d'après ces cartes sont présentées dans le tableau I.3. Lors des analyses, une moyenne a été faite par pays.

Tableau I. 3. Plages de valeurs des paramètres environnementaux (gris pâle : valeurs basses ; gris moyen : valeurs moyennes ; gris foncé : valeur importante) mesurés dans les 5 pays échantillonnés entre mars et mai 2011.

	Norvège	Irlande	France	Espagne	Portugal
Température de surface de la mer en °C	8-10	12-14	12-14	12-14	18-20
Radiation Disponibles pour la PS (PAR) en Einstein.m^{-2}.$jour^{-1}$	35-40	30-35	35-40	20-25	40-45
Carbone inorganique en mol.m^{-3}	1.10^{-4} à 3.10^{-4}	3.10^{-4} à 5.10^{-4}	1.10^{-3} à 3.10^{-3}	8.10^{-4} à 2.10^{-3}	6.10^{-4} à 1.10^{-3}
Salinité PSU	34	35	35	36	37

Face à ces conditions environnementales variées, les espèces doivent s'adapter ou au moins s'acclimater et sont pour cela amenées à subir des variations au niveau de leur teneur en macromolécules (polysaccharides, protéines, lipides, pigments) et/ou à produire des composés protecteurs face aux variations des facteurs environnementaux (biotiques ou abiotiques). Parmi les composés de défense produits par les macroalgues brunes, nous avons focalisé tout particulièrement notre attention sur les composés phénoliques. Les différentes macromolécules étudiées ainsi que les composés phénoliques sont décrits ci-dessous.

I.5. Les différents compartiments biochimiques étudiés

L'étude et la quantification des macromolécules présentes dans un organisme (lipides, protéines ou glucides) permettent d'obtenir une information sur l'état physiologique de l'organisme étudié, reflétant par exemple les changements métaboliques en réponse à un stress environnemental donné. Le criblage fonctionnel peut être réalisé avec les méthodes classiques de dosage des macromolécules totales (lipides, protéines, glucides), mais de telles approches impliquent souvent des étapes fastidieuses d'extraction ou de marquage des macromolécules d'intérêt.

I.5.1. Macromolécules

Les macromolécules se définissent comme étant de grandes molécules ayant une masse moléculaire relativement élevée. Elles peuvent être monomériques ou polymériques. Elles jouent un rôle important dans la formation des structures macromoléculaires et ils sont synthétisés par l'intermédiaire de la liaison covalente de certaines molécules biologiques comme par exemple les acides aminés, les nucléotides et les hydrates de carbones. Ces macromolécules sont souvent utilisées ou étudiés pour diverses applications décrites ci-dessous pour chacune des molécules étudiées. Les polymères, d'origine biologique, sont regroupés selon leurs structures moléculaires. Ici nous nous sommes intéressés aux trois grandes catégories de macromolécules présentes chez les organismes et chez les algues également ; il s'agit des protéines, des glucides ou carbohydrates et des lipides.

I.5.1.1. Protéines

Les protéines sont un composant essentiel chez les algues puisqu'elles peuvent être retrouvées sous différentes formes et à différents endroits en tant que composant des parois cellulaires ou encore comme enzymes. Liées à d'autres macromolécules telles que des glucides ou des pigments par exemple elles pourront former des glycoprotéines ou encore des phycobiliprotéines (Figure I.28). Les protéines issues de macroalgues méritent intérêt puisqu'elles ont montré des activités biologiques intéressantes pour la médecine ou les industries pharmaceutiques : propriétés anti-cancéreuse, anti-inflammatoires, anti-bactériennes entre autres (Bourgougnon et Stiger-Pouvreau, 2011 ; Stengel *et al*., 2011). Elles peuvent également être utilisées dans un but nutritionnel notamment grâce à leur richesse en acides aminés essentiel (Dawczynski *et al*., 2007).

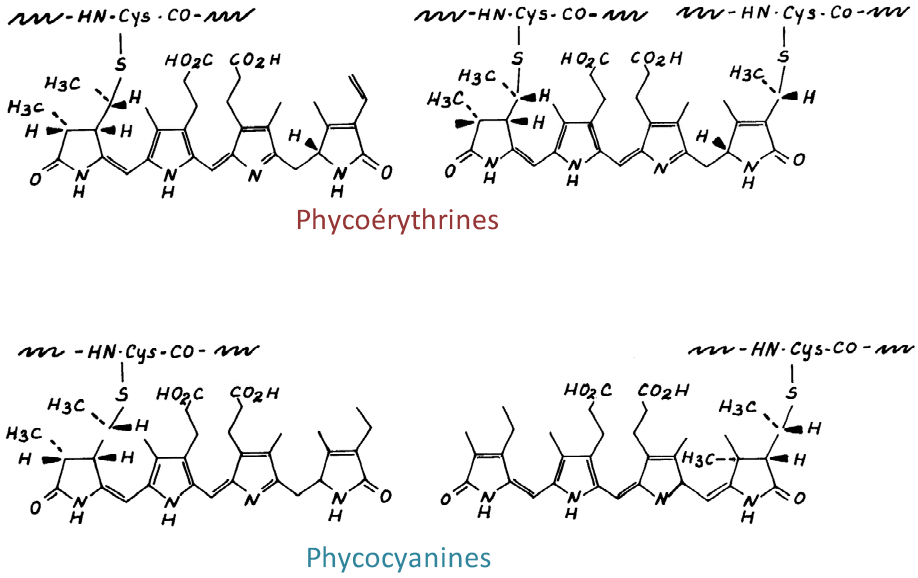


Figure I. 28. Deux phycobiliprotéines d'intérêts isolées chez les algues rouges (phycoérythrine) ou chez certaines cyanobactéries ou « algues bleues » (phycocyanine). D'après Moulin *et al*., 1994.

Les macroalgues sont souvent riches en protéines comparé aux plantes supérieures par exemple (Fleurence, 1999 ; Souchet, 2004) : de 3 à 47% de leur poids sec suivant les espèces et surtout suivant le groupe auquel elles appartiennent. En effet, les algues rouges peuvent être constituées à plus de 47% de protéines alors que les algues brunes ne contiennent seulement que de 3 à 15% (Harnedy et FiztGerald, 2011). Cependant, comme toutes les macromolécules, le contenu protéique **varie en fonction de divers paramètres tels que la saison, la température, la salinité, la luminosité, l'origine géographique ainsi que de la quantité de nutriments disponibles** dans le milieu où vit l'espèce (Stengel *et al*., 2011). La quantité de certains acides aminés (aa), constituants primaires de ces protéines, varie au cours des saisons (Hernandez-Carmona *et al*., 2009). En fonction des conditions environnementales différents assemblages d'acides aminés vont avoir lieu pour former les protéines et/ou enzymes nécessaires. Ainsi certains acides aminés ne sont présents qu'en hiver et au début du printemps (Galland-Irmouli *et al*., 1999). En effet, il a été démontré que la quantité de

protéines était directement dépendante de la quantité d'azote dans l'eau environnante. Cette quantité d'azote étant plus importante l'hiver, la quantité de protéines aura tendance à augmenter durant l'hiver et jusqu'au début du printemps (Gorham et Lewey, 1984 ; Marinho-Soriano *et al*., 2006 ; Stengel *et al*., 2011). Marinho-Soriano *et al.* (2006) ont montré, chez *Sargassum sp.* une corrélation négative entre la quantité de protéines et le niveau de salinité par exemple. Enfin, certains polluants sont susceptibles d'entraîner des changements dans la composition en protéines ou d'en diminuer la quantité (Contreras *et al*., 2010). Certains auteurs ont également montré que certains de **ces changements pouvaient intervenir à petite échelle et sur le court terme** (Lopez-Figueroa, 1992 ; Sampath-Wiley *et al*., 2008) rendant donc difficile l'interprétation (la mise en avant des paramètres influant réellement sur la quantité de protéines).

I.5.1.2. Glucides

Les algues sont connues également pour leur richesse en glucides ou carbohydrates (hydrates de carbone), sous forme essentiellement polymérique. Les polysaccharides sont des polymères de monosaccharides et peuvent représenter plus de 60% du poids sec des algues suivant les espèces (Marinho-Soriano *et al*., 2006; Rioux *et al*., 2007). Ces polysaccharides représentent la réserve nutritive principale chez les algues. Présent en quantité importante chez les algues brunes, le laminarane (Figure I.29) est la molécule de réserve la plus importante. Elle peut s'accumuler à raison de 2 à 34% du poids sec de l'algue. On retrouve d'autres types de glucides chez les Phaeophyceae, tels que : alginates, cellulose, fucoïdane, 1,3-β-glucane, .. (Stengel *et al.*, 2011). De nombreuses espèces d'algues possèdent une paroi riche en polysaccharides. La cellulose par exemple est présente chez les algues en tant que polysaccharide structural et sa quantité peut varier de 5.7 à 14% selon l'espèce ou les conditions environnementales (Park *et al.*, 2000). La composition des parois et donc la quantité de polysaccharides varie en fonction de différents facteurs. **Ainsi, cette quantité va être dépendante : de la saison, de facteurs environnementaux tels que la température, l'intensité lumineuse, l'hydrodynamisme, profondeur, quantité de sels nutritifs, les contaminants et la salinité ; de leur stade de croissance et du stade de développement** (Black, 1954; Black et Dewar, 1949; Percival et McDowell, 1967; Craigie, 1990 ; Lobban et Harrison, 1997 ; Park *et al*., 2000 ; Ritter *et al*., 2008).

La stimulation de la photosynthèse, et donc la lumière, influe sur la composition et la quantité de glucides présent chez l'algue (Henley, 1990 ; Torres *et al.*, 1995). Ainsi, leur quantité va donc varier au cours de l'année : suite à une baisse de l'activité photosynthétique et de la température, les réserves en carbone vont être remobilisées. Mais **l'influence des paramètres environnementaux ne va pas être la même suivant le type de glucide** ; par exemple :

- Cas du laminarane : il est synthétisé en grande quantité dans les frondes lorsque l'algue se retrouve en période de restriction azotée entre la **fin du printemps et durant l'été** (Chapman et Craigie, 1977; Gagné *et al*., 1982). En revanche, lorsque le taux d'azote disponible est constant (sans limitation), la teneur en laminarane diminue (Anderson *et al.*, 1981; Gagné *et al*., 1982).

- Cas du fucoïdane : contrairement au laminarane, son maximum est généralement atteint à **l'automne et au début de l'hiver** (Doner et Whistler, 1973). Par ailleurs, une des fonctions du fucoidane est d'empêcher le desséchement des algues lorsqu'elles sont découvertes par la marée (Percival et McDowell, 1967).
- Cas du mannitol : il est accumulé en réponse au stress osmotique (Bäck *et al.,* 1992). En effet, celui-ci joue également le rôle de molécule osmorégulatrice dans le cas de stress salin. La structure de celui-ci est présentée sur la Figure I.29.

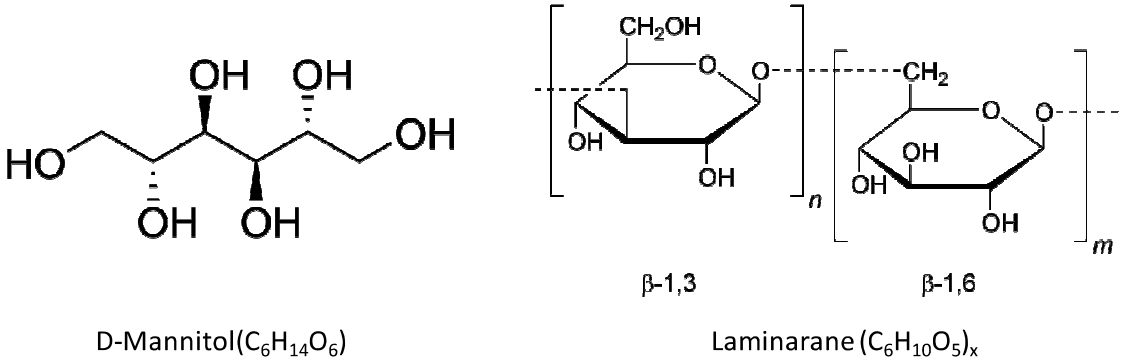


Figure I. 29. Formule chimique et structure de deux glucides présents en grandes quantités chez les macroalgues brunes.

D'une façon générale, la disponibilité des sels nutritifs, principalement le nitrate, influence la productivité des algues (Edwards *et al*., 2006; Gordillo *et al*., 2006; Harlin et Craigie, 1978) mais agit également sur la structure, la composition et la bioactivité des polysaccharides. Par ailleurs, lors de contamination des eaux au cuivre, les quantités de polysaccharides dans les parois peuvent augmenter (Riter *et al*., 2008).

La variété de propriétés attribuées aux polysaccharides algaux ainsi que leurs applications sont proportionnelles à la variété de différents glucides retrouvés chez les algues. Ainsi, on leur attribue des propriétés: anti-virales, anti-oxydantes, anti-inflammatoires (Stengel *et al.*, 2011), ils sont donc utilisés dans l'industrie médicale ou cosmétique, en agroalimentaire pour leurs propriétés gélifiantes (Michel *et al*., 2006 ; Rinaudo, 2007) ou en agriculture pour leur capacité à retenir l'eau (Stengel *et al*., 2011). Etant solubles dans l'eau leur extraction est relativement facile.

NB: D'autres facteurs influencent le contenu en polysaccharides tels que l'âge de la population d'algue, la période de récolte et les traitements post-récoltes (séchage, entreposage, etc…) (Black *et al*., 1952; Haug et Jensen, 1956; Wedlock *et al*., 1987 ; Zvyagintseva *et al*., 2003).

I.5.1.3. Lipides

Les lipides naturels sont des assemblages de deux types de composés jouant le rôle de briques élémentaires : les groupes cétoacyles et les unités isoprènes. Ils peuvent être classés en huit catégories différentes dont les acides gras, catégorie qui nous intéressera dans ce manuscrit.

Les acides gras sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique. Ils possèdent une chaîne carbonée, constituée de 4 à 36 atomes de carbone en nombre pair, leur conférant leur caractère hydrophobe. La chaîne hydrocarbonée des acides gras, peut être saturée ou insaturée et présenter une isomérie cis/trans. Les acides gras insaturés naturels ont souvent une configuration cis leur donnant ainsi une conformation permettant de fluidifier les bicouches lipidiques. A l'exception de quelques espèces pour lesquelles il peut atteindre plus de 6 % du poids sec (cas de *Sargassum kjellmaniamum*) (Sánchez-Machado *et al*., 2004), le contenu lipidique chez les algues marines est généralement bas et souvent inférieur à 4% de leur poids sec (El-Naggar, 1994; Fleurence *et al*., 1994; Kurami *et al*., 2009). Chez les algues brunes, les acides gras comprennent les formes primaires C16, C18 et C20. L'acide palmitique (16 :0) est considéré comme l'acide gras le plus important ; il est retrouvé en quantité supérieure à 10-15% (Takagi *et al*., 1985 ; Sukenik *et al*., 1989 ; Fleurence *et al*., 1994 ; Napolitano, 1994 ; Stengel *et al*., 2011 ; Gerasimenko *et al*., 2010). L'acide gras monoinsaturé prédominant est l'acide oléique (18:1 w9, Figure I.30) (Gerasimenko *et al*., 2010). D'une manière générale, les principaux acides gras retrouvés chez les algues brunes sont : 16:0, 18:1, 18:2, 18:4, l8:3, 20:4, 20:5 and 14:0 (Figure I.30) (Takagi *et al*., 1985 ; Sukenik *et al*., 1989 ; Fleurence *et al*., 1994 ; Napolitano, 1994 ; Stengel *et al*., 2011 ; Gerasimenko *et al*., 2010). Chez les macroalgues, les acides gras insaturés sont généralement présents en plus grande quantité que les AG saturés (Fleurence *et al*., 1994).

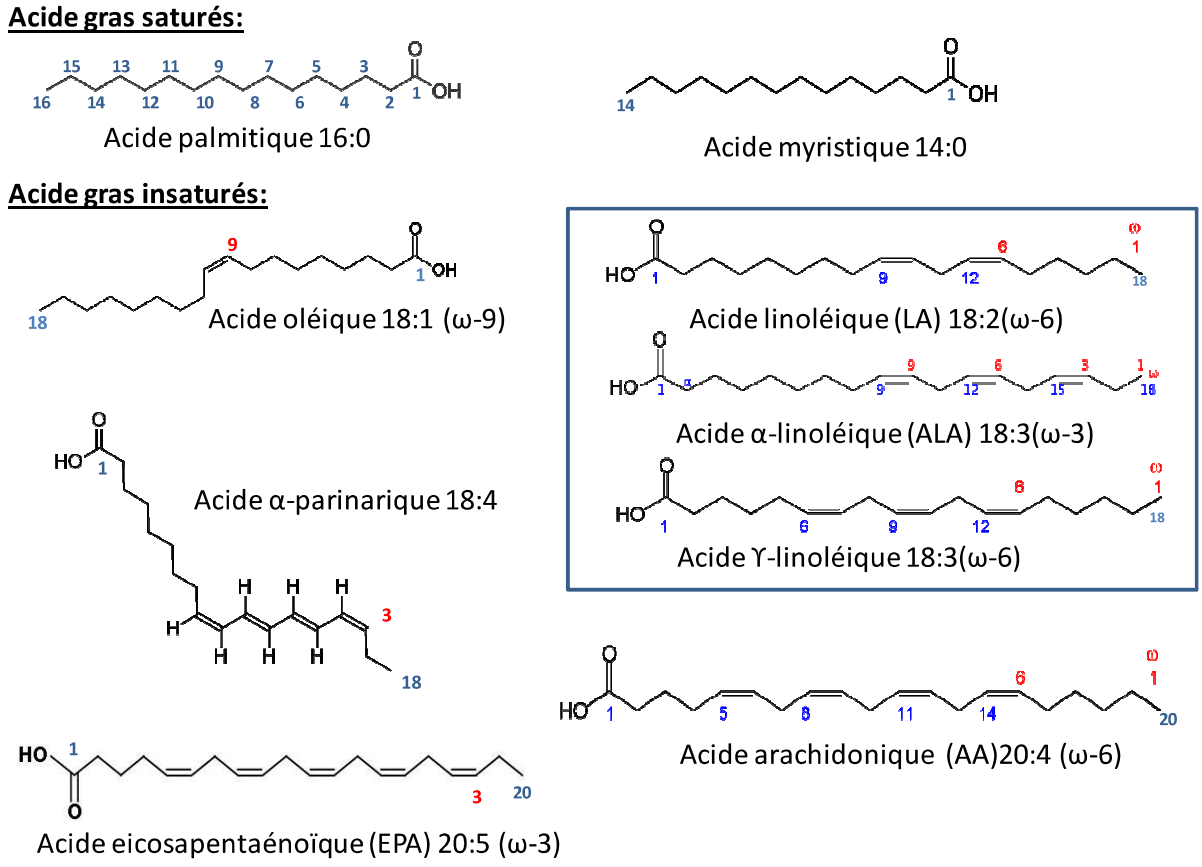


Figure I.30. Principaux acides gras rencontrés chez les algues brunes

Les acide gras provenant des algues sont connus pour avoir de nombreuses propriétés : anticancéreuses, antivirales notamment (Sánchez-Machado *et al*., 2004). De plus les lipides issus d'algues marines, sont riches en anti-oxydant comme le tocopherol, qui est utilisé dans les industries pharmaceutique ou cosmétique (Norziah et Chio, 2000; Dawczynski *et al*., 2007). Certains acides gras, en particulier les acides gras « oméga-3 » et « oméga-6 », dits «essentiels », ne peuvent être synthétisés en quantité suffisante par l'organisme des mammifères et doivent alors être apportés entièrement ou partiellement par leur régime alimentaire. Plus précisément, les mammifères sont incapables de synthétiser l'acide α-linolénique (ω-3) et l'acide linoléique (ω-6), mais peuvent en revanche convertir par exemple l'acide α-linolénique en acide docosahexaénoïque (DHA), un ω-3 (Figure I.30). Aussi les algues peuvent être une source intéressante d'acides gras essentiels sous forme de compléments alimentaires par exemple.

Généralement, la quantité de lipides et leur composition, incluant les différents types d'acides gras présents, sont dépendant de nombreux facteurs de variations tels que : **la saison, la provenance géographique, la température de l'eau, les contaminants (cuivre par exemple) et les conditions de croissance** (Harwood et Jones, 1989 ; Al-Hasan *et al*., 1990; Jones et Harwood, 1993 ; Meiser *et al*., 2004; Terasaki *et al*., 2009 ; Stengel *et al*., 2011). La composition en acides gras va donc varier en fonction de la position géographique des algues. Ainsi, il a été démontré, chez les algues vertes ; que les algues provenant des eaux chaudes contenaient plus d'acides gras saturés et d'acide oléique (18 :1) alors que celles provenant des eaux froides contenaient davantage d'acides gras polyinsaturés (Kumari *et al*., 2009, Stengel *et al*., 2011). Il a été montré par ailleurs que la quantité d'acide oléique pouvait augmenter avec l'augmentation de lumière et/ou de la température (Kumari *et al*., 2009); en conséquence, cet acide gras est souvent retrouvé en plus grande quantité en été (Gerasimenko *et al*., 2010). Pour une espèce, les changements de composition en acides gras dépendent de la saison et sont donc relativement rapides (Honya *et al*., 1994 ; Kim *et al*., 1996 ; Sanina *et al.,* 2008). Certaines études ont montré qu'au printemps et en été, la quantité d'acides gras insaturés (AGI) était bien supérieure à celle des acides gras saturés (AGS) même si cette différence s'atténue en fin de période estivale (Gerasimenko *et al*., 2010). Enfin, certains auteurs ont montré que les algues étaient capables d'accumuler des acides gras polyinsaturés en réponse à des conditions de faible luminosité (Napolitano, 1994; Sukenik *et al.*, 1989). Gerasimenko *et al.* (2010) ont d'ailleurs montré que les quantités d'acides gras 18:4 et 20:5 avaient tendance à diminuer avec un faible éclairement.

NB : Cas des glycérolipides : Il s'agit de protéines membranaires dans lesquelles un ou plusieurs résidus de glucides sont liés à une structure lipidique. Certaines ont montré des activités anti-microbiennes intéressantes (Stengel *et al.*, 2011). Ainsi, Plouguerné *et al.* (2010a) ont isolé des glycolipides de *Sargassum muticum* possédant une activité antimicrofouling.

I.5.2. Pigments

L'activité photosynthétique est le processus bioénergétique primaire de la production des organismes photoautotrophes. Elle fournit la source d'énergie nécessaire à la croissance, la reproduction, la production de métabolites secondaires et la formation de réserves chez les algues notamment. C'est au niveau des photosystèmes, dans des membranes lipoprotéiques appelés thylakoïde, contenues dans les chloroplastes, que va s'initier la photosynthèse (PS). Ces photosystèmes sont constitués de complexes pigments/protéines (LHC pour Light-Harvesting Complexes) ou antenne collectrice composée de différents pigments qui vont absorber l'énergie (lumière visible entre 400 et 700 nm, correspondant aux radiations actives pour la photosynthèse, PAR) et la transférer vers le centre réactionnel (CR), où l'énergie d'excitation est transformée en énergie photochimique. Les pigments majoritaires qui composent ces antennes chez les algues brunes sont la chlorophylle *a* (Chl *a*), la chlorophylle *c* (Chl *c*), la fucoxanthine, la violaxanthine et le β-carotène (Alberte *et al.*, 1981 ; De Martino *et al.*, 2000) (Figure I.31).

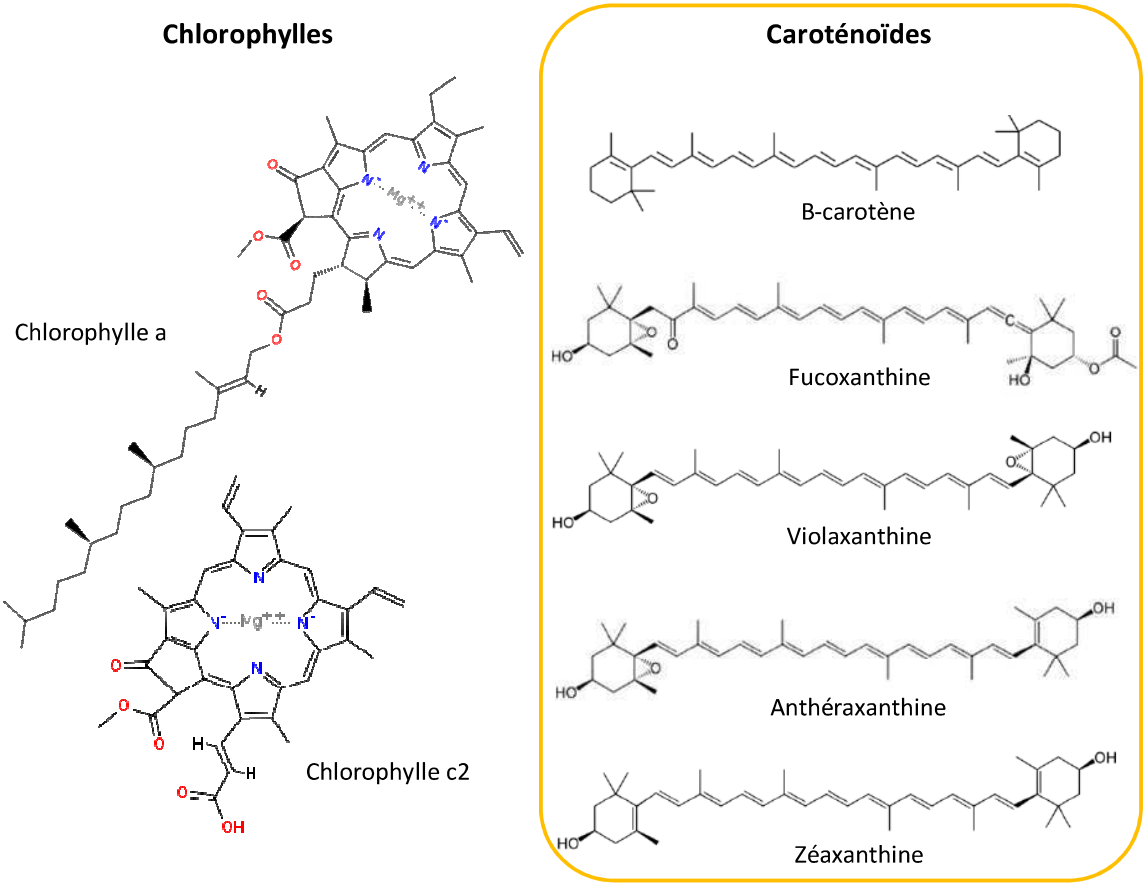


Figure I.31. Principaux pigments rencontrés chez les algues brunes.

Les chlorophylles a et c sont des pigments verts, mobilisés dans l'absorption de l'énergie lumineuse. Les caroténoïdes, molécules lipophiles polyinsaturées, présentes en grande quantité chez les algues brunes, masquent la couleur verte des chlorophylles et donnent aux algues leur couleur brun-orangé. Parmi ces caroténoïdes, on distingue une

famille particulière, celle des xanthophylles, comprenant par exemple : la fucoxanthine, la violaxanthine, l'anthéraxanthine et la zéaxanthine (Figure I.31). L'algue est capable, grâce à certains pigments, de mettre en place une stratégie de photoprotection permettant de réguler le rendement photosynthétique, notamment en fonction des conditions d'éclairement, et ainsi de protéger les CR contre la photo-oxydation en cas de luminosité trop intense, en limitant la production d'espèces réactives de l'oxygène. Cette stratégie, faisant appel à la modulation des quantités de violaxanthine, d'anthéraxanthine et de zéaxanthine, s'effectue grâce au cycle des xanthophylles (Figure I.32) qui a lieu dans les chloroplastes (Demmig-Adams et Adams, 1992). Ainsi, une très forte intensité lumineuse va activer une enzyme (violaxanthine dé-époxydase) capable de transformer violaxanthine en anthéraxanthine dans un premier temps, puis l'anthéraxanthine en zéaxanthine (Ruban *et al.*, 2007) par un mécanisme de dé-époxydation. La zéaxanthine sera alors capable de dissiper l'excès d'énergie produit par la PS sous forme de chaleur et ainsi de limiter la formation de molécules oxydantes. A l'inverse, quand les algues se retrouvent en situation d'obscurité, et que la PS nécessite plus d'énergie, alors une autre enzyme est à son tour activée (zéaxanthine époxydase) et va convertir la zéaxanthine en anthéraxanthine puis en violaxanthine (Goss et Jakob, 2010) par un mécanisme de dé-époxidation. Par ailleurs, l'implication de la fucoxanthine dans les mécanismes de détoxification des molécules oxydantes produites lors de la PS a également été mise en évidence (Sachindra *et al.*, 2007 ; Heo et Jeon, 2009 ; Le Lann, 2009).

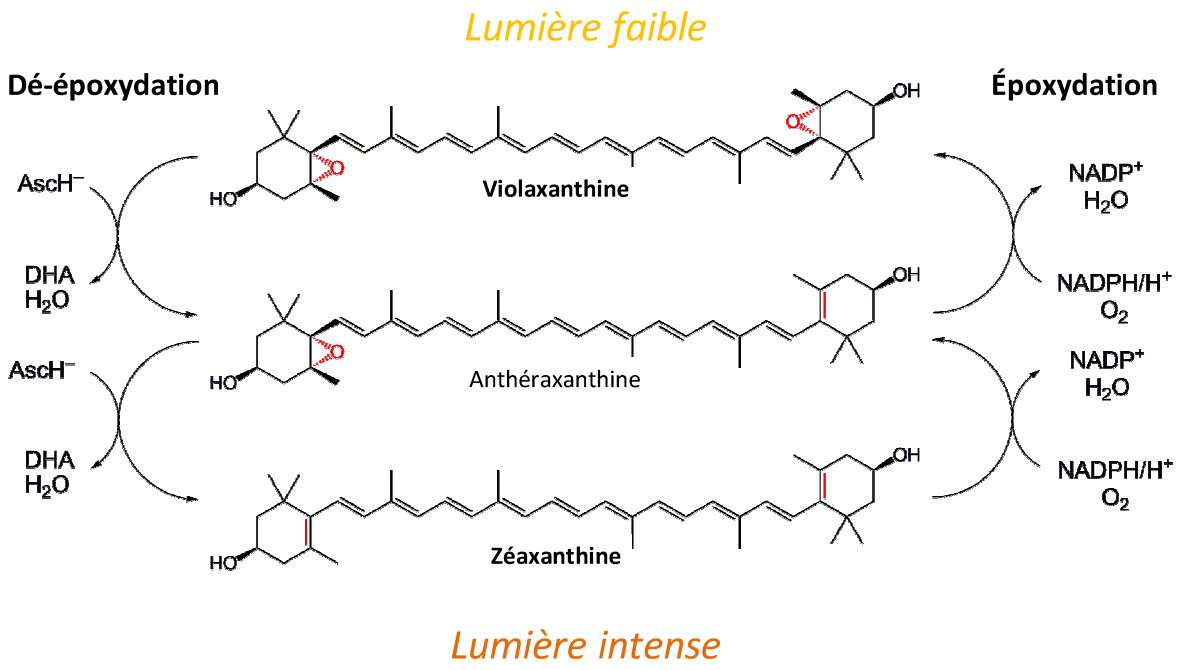


Figure I.32. Cycle des Xanthophylles. Modifié d'après Jégou (2011).

L'activité photosynthétique, et donc, le cortège pigmentaire des algues, sont dépendants des facteurs environnementaux comme la lumière (Ensminger *et al.*, 2005), la température (Davison, 1991), l'hydrodynamisme (Hurd, 2000) et la disponibilité en nutriments (Henley et Dunton, 1997). Ces facteurs environnementaux vont être les déterminants de la distribution, l'abondance, la croissance et la production des macroalgues

(Gerard, 1984 ; Davison, 1991 ; Markager et Sand-Jensen, 1992 ; Häder et Figueroa, 1997 ; Steneck *et al.*, 2002 ; Roleda *et al.*, 2005 ; Wiencke *et al.*, 2006). Les facteurs environnementaux sont très variables dans les écosystèmes côtiers (Drew, 1983 ; Kain, 1989 ; Hanelt *et al.*, 1993 ; Dring et Lüning, 1994). Les changements journaliers et saisonniers des paramètres environnementaux contraignent les macroalgues à **ajuster et optimiser leurs performances photosynthétiques**. Ainsi, Gévaert *et al*. (2003, 2002) ont montré que le cycle des xanthophylles jouait un rôle primordial lors des marées. En effet, chez *Laminaria saccharina*, la violaxanthine est progressivement convertie en zéaxanthine au cours de la marée descendante dissipant ainsi l'excès d'énergie lié à la forte intensité lumineuse à marée basse, et la conversion s'inverse lors de la marée montante. En revanche, les autres pigments tels que la Chl a, la Chl c, la fucoxanthine et le β-carotène ne seraient pas affectés par ces phénomènes de marée. Demmig Adams et Adams (1996) ont également montré, pour des feuilles de plantes supérieures, que le rapport Chlorophylles/caroténoïdes diminuait en cas d'exposition trop importante à la lumière mettant ainsi en avant l'importance de l'ajustement des proportions des différents caroténoïdes en cas de fortes luminosités.

Certains pigments intéressent également les industries. Ainsi, la fucoxanthine, pigment retrouvé en grande quantité chez les algues brunes par exemple est connue pour ses nombreuses activités pharmaceutiques comme par exemple son activité antioxydante (Yan *et al.,* 1999), anti-obésité (Maeda *et al.,* 2007, Jeon *et al.,* 2008) et anti-diabétique (Maeda *et al.,* 2007).

I.5.3. Composés phénoliques

D'après la littérature, de nombreux auteurs se sont intéressés à l'identification des différents facteurs de variabilité des teneurs en composés phénoliques chez les macroalgues. Ainsi nous savons par exemple que celle-ci peut varier selon quelques paramètres environnementaux tels que la température (Phillips et Towers, 1982 ; Plouguerné *et al*., 2006), la salinité (Pedersen, 1984 ; Marinho-Soriano *et al*., 2006 ; Plouguerné *et al*., 2006 ; Connan et Stengel, 2011b) de l'eau de mer, ainsi que le substrat (Plouguerné *et al*., 2006 ; Le Lann *et al*., 2012a).

A ces notions de variations « environnementales » viennent s'ajouter les notions de variation spatiale et temporelle des composés phénoliques, beaucoup plus documentées. Ainsi la teneur en phlorotannins chez les algues brune varie au sein même d'un individu (Tugwell et Branch, 1989, Pavia *et al*., 2003, Connan *et al*., 2006) ; dans une même population (Fairhead *et al*., 2005) ; entre espèces (Connan *et al*., 2004 ; Stiger *et al*., 2004 ; Le Lann et Stiger-Pouvreau, 2009 ; Le Lann *et al.*, 2011) ; selon le stade de développement ou l'âge (Stiger *et al*., 2004 ; Pavia *et al*., 2003) ; entre différentes populations d'une même espèce (Stiger *et al.*, 2004 ; Plouguerné *et al*., 2006 ; Le Lann et Stiger-Pouvreau, 2009 ; Le Lann *et al.*, 2012a) et enfin selon la saison d'échantillonnage (Connan *et al.*, 2004 ; Stiger *et al.*, 2004 ; Plouguerné *et al*., 2006 ; Le Lann et Stiger-Pouvreau, 2009).

I.5.3.1. Structure des phlorotannins :

Les composés phénoliques ou phlorotannins sont des polymères de phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene). Ils sont formés par l'association d'un monomère, le phloroglucinol, dont les unités sont liées par des ponts carbones-carbones ou diaryl éther. La gamme de taille des composés phénoliques est située entre 126 Daltons (Da), correspondant au phloroglucinol libre, et 6.10^5 Da=600 KDa, correspondant à environ 4800 unités de phloroglucinol. Cependant, les plus couramment rencontrés ont une taille comprise entre 10 000 et 100 000 Da (Boettcher et Targett, 1993). Ces composés présentent une très large gamme de structures chimiques, comprenant toutes un cycle aromatique (Richter, 1993). Les composés phénoliques portent ainsi sur leur cycle, un ou plusieurs groupements hydroxyles et sont formés en très grande majorité par des atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. On peut les classer en 6 groupes et trois-sous classes en fonction du type de liaisons engagées entre les unités de phloroglucinol: les phlorotannins à liaisons phenyl (fucols), éther (fuhalols et phlorethols), phenyl plus éther (fucophlorethols), et plus rarement dibenzodioxine (eckols et carmalols), souvent avec des variantes halogénées chez les algues brunes (Figure I.33) (Ragan et Glombitza, 1986). Certains de ces composés sont hydrosolubles (cas des petites molécules en particulier) alors que d'autres sont partiellement liposolubles. Les composés phénoliques sont rencontrés chez les végétaux supérieurs (Rohner et Ward, 1997), les lichens (Hyvarinen *et al*., 2000), les macroalgues (revue de synthèse par Ragan et Glombitza, 1986) mais également chez les bactéries et les champignons (Arnold et Targett, 2002).

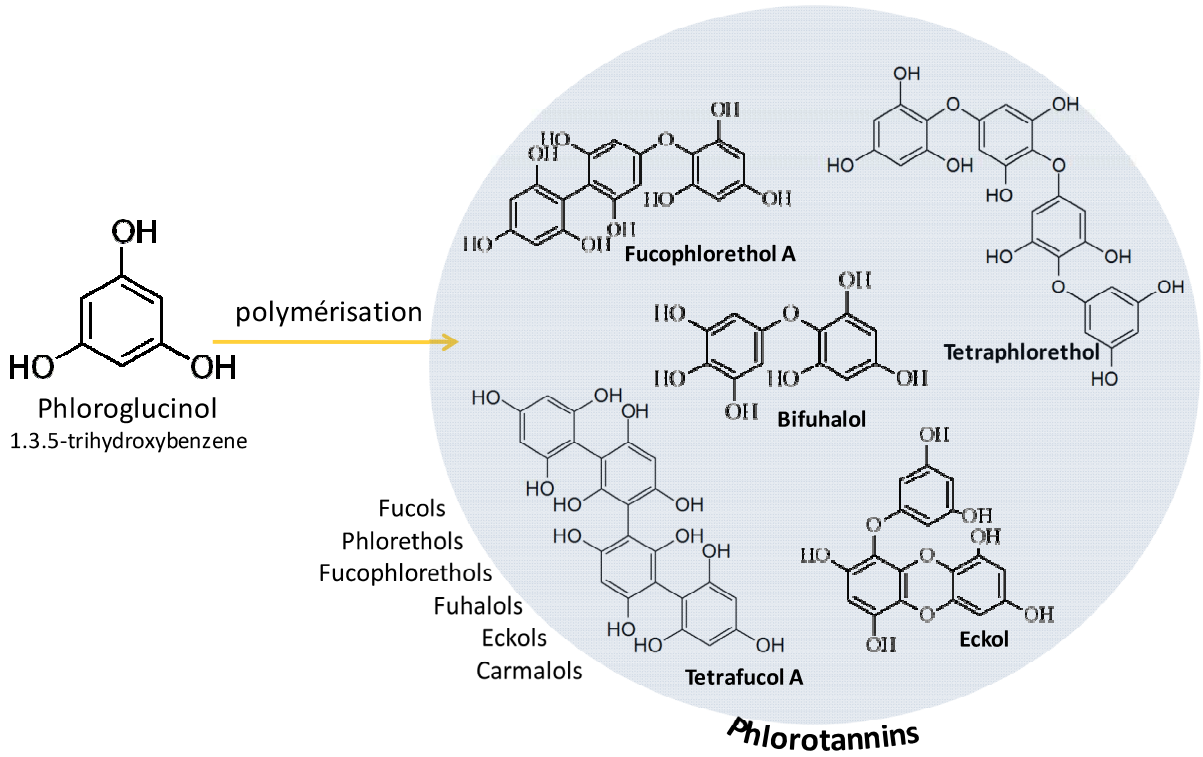


Figure I.33. Structures chimiques illustrant les 6 classes de Phlorotannins retrouvés chez les Phaeophyceae. Les Phlorotannins sont classés en fonction de la structure du polymère de phloroglucinol (d'après Ragan et Glombitza, 1986 ; Amsler et Fairhead, 2006 ; Kornprobst, 2006 ; Singh et Bharate, 2006)

Chez les macroalgues, les composés phénoliques ont été retrouvés chez certaines chlorophycées (Flodin et Whitfield, 1999) ; rhodophycées (Ragan et Craigie, 1978) ; et phaeophycées chez lesquelles les phlorotannins sont particulièrement abondants (Rangan et Glombitza, 1986). En effet, chez les algues brunes, parmi les différentes classes de composés retrouvés (Tableau I.4), la majorité des composés phénoliques décrits sont des phlorotannins (Glombitza *et al*., 1976 ; Glombitza *et al*., 1977, Glombitza *et al*., 1978 ; Glombitza et Pauli, 2003). Ils sont retrouvés en quantités très importantes, en particulier chez les fucales où ils peuvent dépasser 20% poids sec des algues (Ragan et Glombitza, 1986). Plusieurs structures de faible poids moléculaire (oligomères) ont été identifiées chez de nombreuses espèces d'algues brunes dont du phloroglucinol libre (Jégou, 2011). Certaines de ces structures peuvent également être halogénées ou sulfatées, ce qui leur confère des activités biologiques variées (Cabrita *et al*., 2010 ; La Barre *et al*., 2010). D'autres types de composés phénoliques, moins courant, ont été caractérisés, comme des colpol, chez l'algue brune *Colpomenia sinuosa* (Green *et al*., 1993). Des composés de type terpènoïdes ont également été trouvés et caractérisés chez les algues brunes qui contiennent surtout des meroditerpènes retrouvés quasi exclusivement chez les Sargassassées (Reddy et Urban, 2009). Par ailleurs aucun composé phénolique de type flavonoïdes, habituellement retrouvé chez les plantes terrestres, comme les anthocyanines et les flavones, n'a été trouvés chez les algues (Stengel *et al*., 2011).

Tableau I.4. Différentes classes de composés phénoliques retrouvés chez les algues brunes. D'après Stengel *et al*., 2011.

Classe de composés phénoliques	Exemples	Auteurs
Phlorotannins	Phloroglucinol; fucols, fucophlorethols, fuhalols, phlorethols; eckols, eckstolonol, phloroeckol, phlorofucofuroeckol-A, triphlorethol-A, dioxinodehydroeckol; carmalol, diphlorethohydroxycarmalol	Ragan et Glombitza, 1986; Sinha *et al.*, 2007; Heo et Jeon, 2009; Jung *et al.*, 2009; Jegou, 2012; Carreto et Carignan, 2011
Métabolites C6-C4-C6	Copol,8,9-dihydrocopol	Green *et al.*, 1993
Meroditerpènoïdes	Plastoquinones, acide sargaquinoïque , sargachromanols, dérivés du chromène	Reddy et Urban, 2009
Bromophenols	2-bromophenol, 4-bromophenol; 2,4-dibromophenol; 2,6-dibromophenol; 2,4,6-tribromophenol	Chung *et al.*, 2003

NB : Certains phlorotannins peuvent être associés à des mono- ou polysaccharides. Ils constituent la majeure partie des composés phénoliques chez *A. nodosum* par exemple (Ragan et Glombitza, 1986).

Chez les Phéophycées, les composés phénoliques sont localisés principalement dans des organites subcellulaires particuliers, appelés physodes, eux-mêmes localisés dans le cytoplasme ou liés aux membranes des cellules algales (Ragan et Glombitza, 1986 ; Schoenwaelder, 2002). Les phlorotannins sont aussi retrouvés au sein des parois cellulaires (Schoenwaelder et Clayton, 1999), où ils sont incorporés après libération des physodes. Concernant la biosynthèse de ces composés, 2 voies hypothétiques sont proposées dans la littérature : les phlorotannins seraient synthétisés soit via la voie de l'acétate-malonate (Arnold et Targett, 2002) ou via la voie de l'acide shikimique, de la même façon que pour les tannins des plantes vasculaires (Chen *et al.,* 1997).

NB : Arnold et Targett (2003) ont proposé un modèle où la biosynthèse des phlorotannins serait effectuée au niveau de l'appareil de Golgi. Les composés phénoliques sont ensuite transportés et localisés sous forme de défense active dans les physodes. Puis ces composés sont oxydés par des peroxydases au niveau de la paroi cellulaire. Ils deviennent ainsi inactifs et forment des complexes avec l'acide alginique.

I.5.3.2. Teneur chez les macroalgues brunes

Les algues brunes présentent des teneurs en composés phénoliques le plus souvent comprises entre 1 et 10% MS (Ragan et Glombitza, 1986). Les Fucales et les Dictyotales sont les plus riches en composés phénoliques qui représentent jusqu'à 20% de la matière sèche chez les fucales et les jusqu'à 30% de la matière sèche chez les Dictyotales (Ragan et Glombitza, 1986 ; Targett *et al*., 1995).

Les sources de variations de la teneur en composés phénoliques chez les macroalgues sont nombreuses (Tableau I.5). Elles interviennent à différentes échelles d'espace (variation géographiques) (Steinberg, 1989 ; Targett *et al*., 1992 ; Van Alstyne *et al*., 1999a) et de temps (variations temporelles) (Rönnberg et Ruokolahti, 1986 ; Steinberg, 1995 ; Abdala Diaz, 2001). A ces variations s'ajoute des variations interspécifiques, intra-spécifiques et même inter-individuelles (Ilvessalo et Tuomi, 1989 ; Pavia et Aberg, 1996 ; Toth et Pavia, 2002). De plus, les teneurs en composé phénolique au sein d'une même espèce peuvent être modulées par des facteurs environnementaux (Figure I.34 et Tableau I.5) abiotiques : quantité et nature des radiations lumineuses (notamment des radiations UV), température de l'eau, salinité, concentration en nutriments. Des facteurs biotiques vont également affecter les teneurs en phlorotannins : la présence de brouteurs, la taille des thalles, le stade physiologique ou reproducteur, l'âge et la nature des tissus étudiés. Ainsi, il existe des différences intra-plants ou intra-thalles quantitatives et qualitatives des teneurs en composés phénoliques.

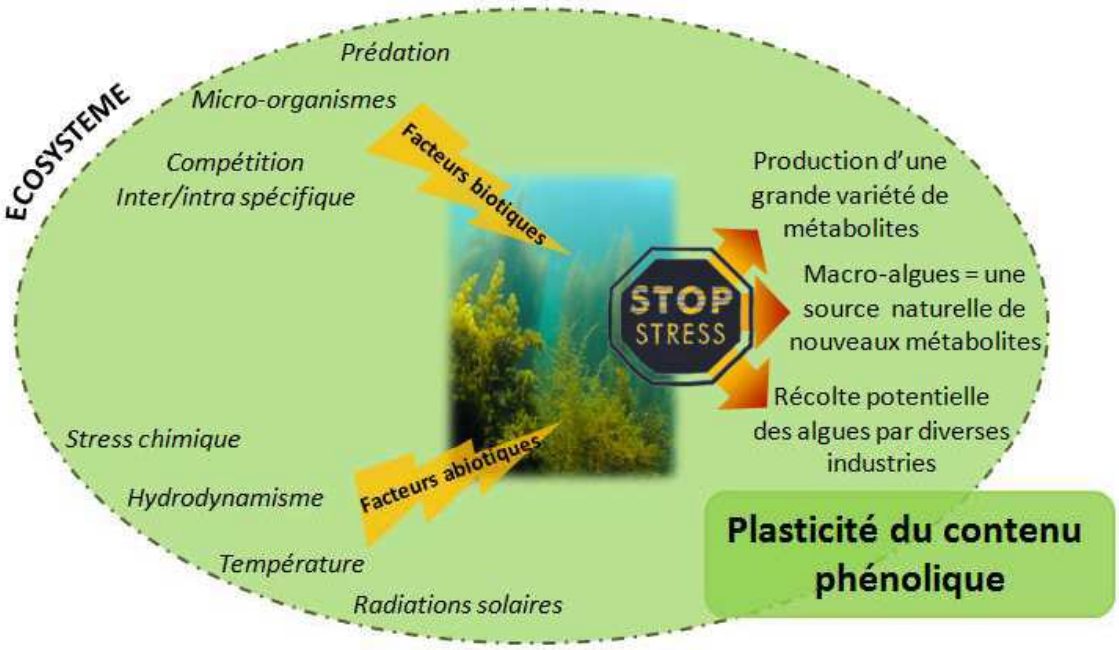


Figure I.34. Influence des paramètres environnementaux (biotiques et abiotiques) sur la teneur en composés de défense sur les macroalgues. D'après Dicke et Hilker (2003)

Tableau I.5. Sources de variations des teneurs en composés phénoliques retrouvées dans la littérature.

Sources de variation		études correspondantes
Echelles de variation		
Spécifiques	Interspécifiques	Connan, 2004; Fairhead *et al.*, 2005; Stiger *et al.*, 2004; Le Lann *et al.*, 2008a
Temporelles (Intra-spécifique)	Saisonnières	Rönnberg et Ruokolahti, 1986; Steinberg, 1995; Connan, 2004; Stiger *et al.*, 2004; Plouguerné *et al.*, 2006
	Journalières	Abdala Diaz, 2001
Géographiques (Intra-spécifique)	Petite échelle: (situation sur l'estran)	Connan, 2004; Fairhead *et al.*, 2005
	Moyenne échelle:	Steinberg, 1989; Targett et al., 1992; Pavia et Åberg, 1996; Toth et Pavia 2000a,b; Pavia *et al.*, 2003; Connan, 2004; Stiger et al., 2004; Plouguerné *et al.*, 2006
	Grande échelle:	Steinberg, 1989; Van alstyne et Paul, 1990; Targett *et al.*, 1992; Van Alstyne *et al.*, 1999b
Concentrations modulées par les facteurs environmentaux:		
Facteurs biotiques	Brouteurs	Amsler, 2001
	Partie du thalle	Tugwell et Branch, 1989; Pavia *et al.*, 2003; Connan, 2004; Fairhead *et al.*, 2005
	Age des tissus	Pavia *et al.*, 2003
	Stade de dévellopement	Ragan et Jensen, 1978; Stiger *et al.*, 2004
	Maturité des thalles	Plouguerné *et al.*, 2006
Facteurs abiotiques	Lumière	De la Coba *et al.*, 2009; Pavia *et al.*, 1997
	Salinité	Ragan et Glombitza, 1986; Pedersen, 1984; Connan et Stengel, 2011a,b
	Température	Phillips et Towers, 1982
	Concentration en nutriment	Pavia et Toth 2000; Arnold, 1995; Koivikko *et al.*, 2005

NB : L'exsudation ou l'excrétion des CP en condition de stress comme lors de l'immersion/émersion des thalles ou encore en réponse à de fortes températures, est un phénomène important chez les macroalgues brunes (Phillips et Towers, 1982 ; Ragan et Glombitza, 1986). Cette libération entraine souvent une coloration jaune-brun de l'eau environnante (Craigie, 1964). A marée basse ce phénomène apporte aux algues une protection supplémentaire face aux radiations lumineuses (Swanson et Druehl, 2002), au broutage et à l'installation d'épiphytes en général (McLachan et Craigie, 1964).

I.5.3.3. Rôles des composés phénoliques chez les macroalgues brunes

Les composés phénoliques bien qu'étant des métabolites secondaires (c'est-à-dire non indispensables à la survie de l'organisme) sont pourtant directement impliqués dans des procédés essentiels chez les macroalgues (Arnold et Targett, 2002) tels que : la photosynthèse, la division cellulaire et la reproduction (Cruz-Rivera et Hay, 2001 ; Targett et Arnold, 2001 ; Honkanen *et al*., 2002 ; Hemmi et Jormalainen, 2004 ; Jormalainen et Honkanen, 2004 ; Kubanek *et al*., 2004 ; Toth *et al*., 2005). Communément caractérisés comme des composés de défense chimique produits en réponse à un stress, les composés phénoliques sont impliqués dans les processus de défense contre des stress biotique tels que : le broutage (Pavia et Toth, 2000a ; Toth et Pavia, 2001a ; Van Alstyne *et al*., 2001 ; Pavia *et al*., 2002 ; Deal *et al*., 2003 ; Jormalainen *et al*., 2003 ; Hemmi *et al*., 2004 ; Jormalainen et Honkanen, 2004 ; Kubanek *et al*., 2004 ; Coleman *et al.,* 2007), les pathogènes, la formation de biofilm par des microorganismes (Ragan et Glombitza, 1986 ; Jennings et Steinberg, 1997 ; Lau et Qian, 2000 ; Lüder et Clayton, 2004 ; Wikström et Pavia, 2004 ; Honkanen et Jormalainen, 2005 ; Mokrini *et al*., 2008) mais également contre certains stress abiotiques tels que : les radiations UV (Pavia *et al*., 1997 ; Pavia et Brock, 2000 ; Schoenwaelder, 2002 ; Swanson et Druehl, 2002 ; Henry et Van Alstyne, 2004 ; Fairhead *et al*., 2006 ; de la Coba *et al*., 2009), la contamination par des métaux (Connan et Stengel, 2011b ; Karez et Pereira, 1995). Quelques composés phénoliques comme les phlorotannins chez les algues brunes, montrent également des fonctions primaires dans la croissance et le développement des parois chez les Fucales (Schoenwaelder et Wiencke, 2000). Ce sont des composants de la paroi cellulaire chez les algues brunes (Schoenwaelder et Clayton, 1999). Ils permettent également la fixation des plantules au substrat (Schoenwaelder, 2002 ; Potin et Leblanc, 2006) et la guérison des blessures via une sécrétion au niveau des tissus lésés (Lüder et Clayton, 2004 ; Amsler et Fairhead, 2006).

NB : Ce système de défense chimique peut être constitutif, inductible ou activé (Hammerstrom *et al.,* 1998). L'activation, processus rapide de l'ordre de la seconde, correspond à la conversion d'un métabolite en un autre plus actif alors que l'induction, processus plus long (heures ou mois) provoque une augmentation de la production d'un métabolite existant (Paul et Van Alstyne, 1992 ; Karban et Badwin, 1997). Quelques exemples de défense activée chez des organismes marins ont été rencontrés mais ils semblent rares et restreints aux effets du broutage (Paul et Van Alstyne, 1992).

I.5.3.4. Activités et utilisation des composés phénoliques

Les composés phénoliques, une fois purifiés ou semi-purifiés, possèdent de nombreuses propriétés intéressantes (Tableau I.6). Mais ces activités varient suivant la concentration, la taille des molécules et le type de composé (Boettcher et Targett, 1993). Par exemple, les composés de type eckol ont montré des activités anti-VIH (Artan *et al.*, 2008), anti-allergiques (Shim *et al.*, 2009). Ils ont également des effets anti-adipogéniques (Kim et Kong, 2010) et neuroprotecteurs (Jung *et al.*, 2009) et peuvent donc avoir des applications potentielles dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Jung *et al.*, 2010 ; Yoon *et al.*, 2008). Les composés bromés tels que les bromophenols sont utilisé en tant qu'agent de saveur dans l'industrie agroalimentaire (Reddy et Urban, 2009). Li *et al.* (2009) ont mis en évidence l'activité antioxydante de ces composés. Zubia *et al.* (2009) présentent également une valorisation de phlorotannins isolés de plusieurs algues brunes bretonnes présentant à la fois de fortes activités antioxydantes et anti-tumorales. Certaines de ces activités ont même été brevetées ces dernières années (Tableau I.6).

Tableau I.6. Principales activités des composés phénoliques exploitées dans l'industrie (en rouge, brevet associés).

Propriétés	Références	Exemple d'application
Antioxydantes	Perez-Rodriguez *et al.*, 2001; Cerantola *et al.*, 2006 ; De la Coba *et al.*, 2009 ; **Yuasa 2010**	Cosmétologie, Pharmacologie
Anti-radicalaire	Pouvreau *et al.*, 2008 ; Parys *et al.*, 2010	
Proctectrices vis-à-vis des rayons Ultra-violets	Hwang *et al.* 2006 ; **Cardozo *et al.* 2007**; De la Coba *et al.* 2009 ; Carreto et Carrigan 2011	Ecran UV naturel
Chelatrices de métaux	Connan et Stengel, 2011 b	-
Anti-fouling	Prakash *et al.*, 1973 ; Harisson et Chan, 1980 ; Lau et Qian, 2000 ; Nakai *et al.*, 2001; Nagayama *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2007 ; Mokrini *et al.*, 2008	Fabrication de peintures anti-fouling
Anti-virales	Artan *et al.*, 2008 ; Lane *et al.*, 2009; **Kim *et al.*, 2010b**	Traitement du VIH, de la malaria
Anti-allergique	Shim *et al* ., 2009 ; **Kim *et al.*, 2010a**	-
Anti-tumorales	Reddy et Urban, 2009	Cancérologie
Anti-parasitaire	dos Santos *et al.*, 2010	-
Neuroprotectrice	Yoon *et al.*, 2008 ; Jung *et al.*, 2009, 2010	Traitement de la maladie d'Alzeihmer
Exhaustrice de goût	Reddy et Urban, 2009	Additif alimentaire

Certaines techniques analytiques et de dosage des molécules citées, et en particulier des composés phénoliques sont utilisée de façon redondante dans ce manuscrit aussi, pour des raisons évidente de clarté, les plus utilisées seront présentées dans un dernier paragraphe.

I.6. Protocoles de dosage et d'analyse classiquement utilisés pour l'analyse des extraits phénoliques

Sont présentés dans ce paragraphe les protocoles de dosages et d'analyse redondant dans le manuscrit. Dans un premier temps, cette thèse étudiant tout particulièrement l'évolution de la teneur en composés phénoliques suivant différents paramètres, le protocole classiquement utilisé pour l'extraction et le dosage des composés phénoliques au laboratoire est présenté. Les techniques spectrométriques (HRMAS et ^{1}H RMN) sont également présentées, ces techniques permettent d'avoir une vue globale du profil chimique des algues ou extraits étudiés. Enfin, deux tests d'activités utilisés de façon répétée afin de qualifier et de quantifier les activités anti-radicalaires et anti-oxydantes des extraits sont décrits.

I.6.1. Extraction et dosage des composés phénoliques

I.6.1.1. Extraction des composés de type polyphénoliques

Le protocole d'extraction des composés phénoliques classiquement utilisé au laboratoire est le suivant : le solvant d'extraction des phlorotannins est un mélange méthanol/eau 1:1 (MeOH50). Dans un flacon à centrifuger de 500 mL, 20 g de poudre d'algue lyophilisée sont extraits avec 300 mL de solvant, sous agitation magnétique (60 tours/min) et à l'obscurité. Les flacons sont disposés dans un bain marie maintenu à 40°C. L'extraction dure trois heures, puis l'extrait brut est filtré sur coton de verre et centrifugé à 4000 tours/min pendant 15 min et à température ambiante. Le surnageant est récupéré et le méthanol est éliminé par évaporation rotative. Le volume est ajusté à 50 mL avec de l'eau distillée. L'extrait brut est conservé au besoin en chambre froide à 8°C et à l'obscurité.

I.6.1.2. Mesure de la teneur en composés phénoliques

La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée par colorimétrie en utilisant un protocole adapté du dosage Folin-Ciocalteu (Le Lann *et al.,* 2008a) tel qu'il est décrit en Figure I.35. Cette technique est connue pour être moins sensible aux interférences, souvent dues à des composés tels que les acides aminés aromatiques (Sanoner *et al.,* 1999). Néanmoins, chez les algues brunes, ces composés représentent moins de 5% des composés réagissant avec le réactif de Folin-Ciocalteu (Toth et Pavia, 2001 ; Connan, 2004). Lors du dosage, l'absorbance est lue à 650 mm (spectromètre Shimadzu UV 160A), en utilisant le phloroglucinol (1,3,5-trihydrobenzene) comme standard. Les teneurs en composés phénoliques sont exprimées en mg de composés phénoliques extraits par g de matière sèche, soit en % MS_{algue} (quand on se rapporte à la matière sèche ayant servie à l'extraction) ou en $\%MS_{fraction}$ (lorsqu'on rapporte la quantité de CP mesurée au poids sec de l'extrait obtenu).

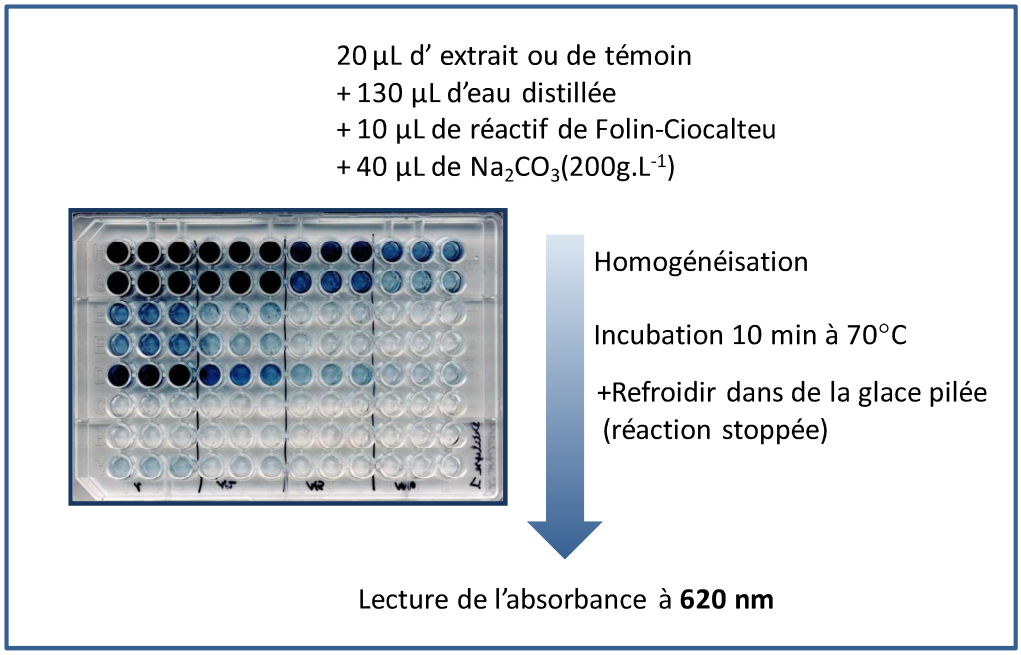


Figure I.35. Protocole résumé du test colorimétrique *in vitro* en microplaques de dosage des composés phénoliques selon la méthode de Folin-Ciocalteu

I.6.2. Obtention d'empreinte chimique par résonance magnétique nucléaire

I.6.2.1. RMN-HRMAS ou RMN in vivo.

Nous avons souhaité trouver une méthode rapide qui nous permette 1) de déterminer la composition chimique initiale de la matière première algale avant transformation (chapitre II et IV), 2) d'estimer l'âge des individus de *Sargassum muticum* (chapitre IV) et 3) d'observer de façon rapide l'évolution du profil chimique chez les macroalgues au cours de l'année ou en réponse à un stimulus donné (chapitre IV). La technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) *in vivo* a été testée sur des individus différents ainsi que sur des parties différentes de l'algue étudiée suivant les expériences menées. Ainsi, un fragment de crampon ou de latérale lyophilisé a été inséré avec de l'eau deutérée dans un rotor, lui-même introduit dans le spectromètre. Les analyses *in vivo* de RMN ont été réalisées à l'aide d'une sonde HR-MAS 1H/31P sur le spectromètre BRUKER DRX Advanced 500 (500 MHz) (Service commun de RMN-RPE de l'UBO).

Cette technique permet ainsi l'obtention, pour la partie de l'algue considérée, d'un spectre montrant des pics, d'intensité et de formes différentes, correspondants aux composés majoritaires présents dans l'échantillon.

I.6.2.2. RMN des solutions

La composition de certains extraits a été analysée grâce à des techniques de RMN du proton ou ^{1}H-RMN sur le spectromètre Bruker Avance 400. Les spectres obtenus ont ensuite été traités sur le logiciel Bruker (Bruker, Wissembourg, France). Les spectres ont été, suivant le solvant utilisé pour l'extraction, enregistrés dans le méthanol deutéré (MeOD) ou dans du

chloroforme deutéré à température ambiante. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm. Les profils RMN obtenus permettent, par exemple, de distinguer de façon efficace les composés de type aromatiques présents dans les échantillons entre 5.5 et 6.5 ppm.

Encadré I.2. **Principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

Principe général :

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique spectroscopique non invasive qui permet d'avoir une bonne accessibilité aux petites molécules. Cette technique analytique développée en 1946 par Felix Bloch et Edward Mills Purcell, est fréquemment utilisée en chimie organique et chimie des substances naturelles. Cette technique permet en effet d'accéder aux structures des molécules et d'étudier l'environnement physico-chimique des édifices moléculaires. Elle se fonde sur les propriétés cinétiques et magnétiques de nombreux noyaux et la possibilité de les faire résonner dans un champ magnétique.

La spectroscopie RMN impulsionnelle à « transformée de Fourier » utilise les propriétés des noyaux en physique quantique : pour chaque noyau est défini un « spin » qui correspond à un moment cinétique (noté I). Placé dans un champ magnétique statique d'intensité B0, les moments magnétiques des noyaux vont s'orienter soit dans la direction du champ B0 (« sens ») soit dans le sens opposé (« anti-sens ») en fonction de leur état d'énergie, c'est-à-dire de leur spin. Ainsi, l'enregistrement du signal RMN n'est possible que dans le cas d'atomes dont le moment cinétique de spin est non nul (les noyaux de spin nul, comme le ^{12}C et le ^{16}O, ne résonnent pas et sont donc « invisibles » par RMN). Les noyaux entrent en résonnance et se répartissent alors à la surface de deux cônes autour et dans le champ. Un second champ magnétique alternatif B1, appliqué perpendiculairement à B0, tourne autour de B0 à une certaine fréquence (fréquence de Larmor des noyaux excités), ce qui induit une bascule de l'aimantation résultante (M0) du plan xoz dans le plan xoy (Figure I.36).

A l'interruption du champ B1 se produit un retour progressif de l'aimantation vers l'axe (Oz). Cette relaxation des noyaux génère un signal magnétique (une sinusoïdale amortie) détecté par une bobine placée sur l'axe (Oy) et que l'on appelle FID (*Free Induction Decay*). La fréquence de résonance dépend surtout de l'intensité du champ magnétique B_0 et de la nature du noyau considéré mais elle est également influencée par l'environnement chimique du noyau au sein d'une molécule. Ainsi le signal FID d'un échantillon RMN est une somme de plusieurs courbes sinusoïdales amorties, de fréquences légèrement différentes par rapport à la fréquence de Larmor.

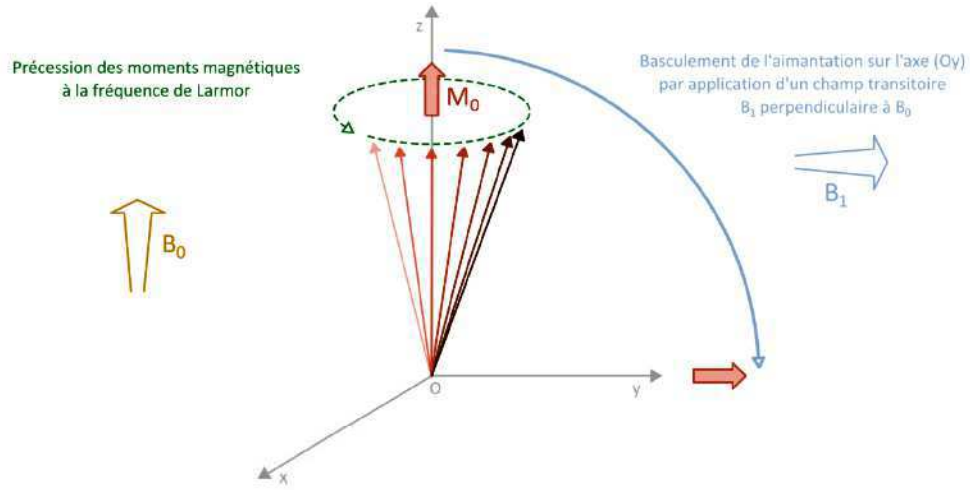


Figure I.36. Champs magnétiques et basculement d'aimantation des noyaux lors d'une expérience RMN à séquence impulsionnelle. D'après Jégou (2011).

L'application d'une transformée de Fourier sur les variations de champ magnétique détectées par la bobine (interférogramme) permet de déconvoluer les différents signaux et de présenter un spectre RMN. Sur ce spectre on observe plusieurs signaux (ou « pics »), chacun d'entre eux étant caractérisé par 1) son déplacement chimique (δ, en ppm), qui illustre l'environnement chimique du noyau considéré au sein d'une molécule, et qui donne une idée du type de fonction chimique impliqué ; 2) sa multiplicité (singulet, double, triplet, etc.), qui témoigne du nombre de noyaux chimiquement différents dans son voisinage. Et enfin, par 3) son intensité, qui lorsqu'on utilise des temps de relaxation suffisants, permet d'établir une correspondance exacte sur le spectre entre intensité des signaux et quantités de protons impliqués.

RMN des échantillons en solutions

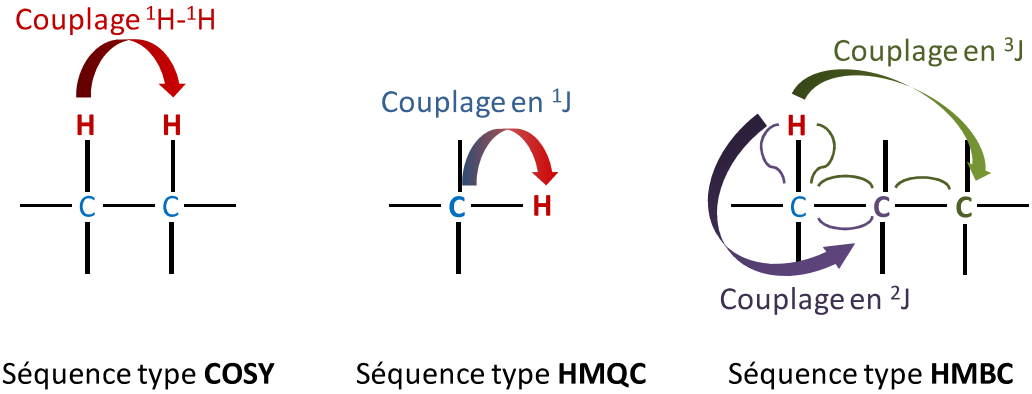
L'utilisation la plus courante de la spectroscopie de RMN est l'analyse d'échantillons en solution. Pour l'étude de substances naturelles, les noyaux les plus couramment utilisés sont : le proton (^{1}H), de spin ½ très abondant dans la nature et le ^{13}C, isotope rare du carbone (<1.1%). Le ^{1}H est très facilement détectable car ses propriétés électromagnétiques le rendent très sensible en RMN. Les extraits ont été solubilisés dans du MeOD ou du $CDCl_3$ (méthanol et chloroforme deutéré : les protons (H) du méthanol et du chloroforme ont été remplacés par des noyaux Deutérium (D)). Des solvants deutérés sont utilisés en RMN car ils permettent de stabiliser les échantillons, d'effectuer le réglage de l'homogénéité du champ magnétique par observation du Deutérium et de minimiser le signal du solvant. En effet les noyaux Deutérium n'ont pas la même fréquence de résonance que les noyaux Hydrogène, ils sont donc invisibles en RMN du proton, néanmoins le solvant reste visible sur le spectre RMN car les produits deutérés n'ont jamais un taux d'enrichissement isotopique de 100%.

Les expériences RMN peuvent se concevoir sur 1 ou 2 dimensions. Dans le cas d'expériences à 1 dimension, le spectre montre les déplacements chimiques pour un seul isotope. C'est le cas pour la RMN du ^{1}H, et la RMN du ^{13}C. Les expériences à 2 dimensions montrent les relations entre différents noyaux au sein d'une même molécule. On distingue par exemple les séquences (Figure I.37) :

COSY (COrrelation SpectroscopY) : séquence homonucléaire $_{1}H$-$_{1}H$ qui relie des protons vicinaux (portés par deux carbones adjacents)

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) : ici séquence hétéronucléaire $_{1}H$-$_{13}C$, elle met en relation les protons et les carbones auxquels ils sont liés ($_{1}J_{H\text{-}C}$).

HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy) : similaire à la précédente, elle permet de relier des protons aux carbones proches ($_{2}J_{H\text{-}C}$ et $_{3}J_{H\text{-}C}$).



Séquence type **COSY** Séquence type **HMQC** Séquence type **HMBC**

Figure I.37. Illustration des différents types de couplage utilisés lors des séquences RMN 2D.

RMN des échantillons solides ou RMN *in vivo*

La RMN du solide, ou RMN HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning), et que l'on appelle également RMN *in vivo* car elle est non invasive et permet généralement de travailler sur des échantillons non transformés (échantillons de tissus vivants, lyophilisés, secs…). Elle a été initiée en 1959 par Raymond Andrew et ses collaborateurs. Le problème des faibles résolutions observées au cours des analyses classiques de RMN peut être compensé par la mise en rotation à haute fréquence (quelques kHz) des échantillons dans un rotor placé à "l'angle magique" (54.7°)[6] par rapport à la direction du champ magnétique B0. Cette technique a permis d'étendre le champ d'application de la RMN aux solides. Puissante et efficace, elle est d'ailleurs de plus en plus utilisée dans de nombreux domaines (Desmoulin *et al.*, 2008) : biologie animale (Gudlavalleti *et al.*, 2006 ; Li, 2006 ; Salaün *et al.*, 2010), végétale (Le Lann *et al.*, 2008b ; Jégou *et al.*, 2010), médecine (Govindaraju *et al.*, 2000 ; Kurhanewicz *et al.*, 2002).

[6] Appelé ainsi car il permet d'obtenir des signaux étroits sur des solides, en réduisant les facteurs d'écrasement des pics en moyennant l'effet anisotropique naturellement compensé sur les échantillons en solution.

I.6.3. Dosage des activités biologiques :

Parmi tous les tests existants, nous avons sélectionné deux tests qui ont l'avantage d'être simples et rapides. Il s'agit du test du DPPH qui permet d'estimer l'activité anti-radicalaire totale des composés hydrophiles et lipophiles, et la méthode du blanchiment du β-carotène qui est un test permettant de déterminer l'activité antioxydante des composés lipophiles.

I.6.3.1.Dosage de l'activité antiradicalaire par spectrophotométrie.

L'activité anti-radicalaire des échantillons a été mesurée par un dosage du radical libre nommé DPPH (2.2 diphényl-1-picrylhydrasyl) modifié d'après Le Lann *et al.* (2008a) (Figure I.38). Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un radical libre, stable en solution : le 2,2 diphényl-1-pycrylhydrasyl. Ce radical accepte un électron ou un atome d'hydrogène pour devenir une molécule stable (Huang *et al*., 2005). Le principe de ce test repose sur la réduction du radical DPPH par des molécules antioxydantes « A », tels que les composés phénoliques pouvant donner un hydrogène (Molyneux, 2004). Ainsi le DPPH est réduit et sa couleur, initialement violette devient jaune pâle. La réduction du DPPH peut être représentée comme suit:

$$DPPH\bullet + A\text{-}H \rightarrow DPPH\text{-}H + A\bullet$$

Le dosage par spectrophotométrie du DPPH est réalisé selon le protocole inspiré de Fukumoto et Mazza (2000). Le protocole a été adapté pour l'utilisation de microplaques. Ainsi, 200 µL de solution de DPPH à 150 µM et 22 µL d'échantillons à tester (extraits algaux ou témoins) sont déposés dans les puits de la microplaque. La plaque est ensuite doucement agitée à la main et stockée pendant une heure à température ambiante et à l'obscurité. La lecture de la microplaque s'effectue ensuite à 540 nm. L'eau distillée est utilisée comme témoin négatif et tous les échantillons sont préparés en triplicat. L'activité antiradicalaire est exprimée sous forme d'un indice IC_{50} correspondant à la concentration nécessaire d'échantillon causant une neutralisation du DPPH de 50%). Cet indice est calculé à partir d'une gamme de concentration. Une concentration trop importante de l'échantillon mène à une réduction complète du radical (inhibition à 100%); inversement, des échantillons trop dilués conduisent à une faible réduction du radical et ne permettent pas d'atteindre 50% d'inhibition. Il est donc important de déterminer préalablement les bonnes gammes de concentration pour chaque échantillon à tester. Plus l'IC_{50} est faible plus l'activité de l'échantillon sera importante.

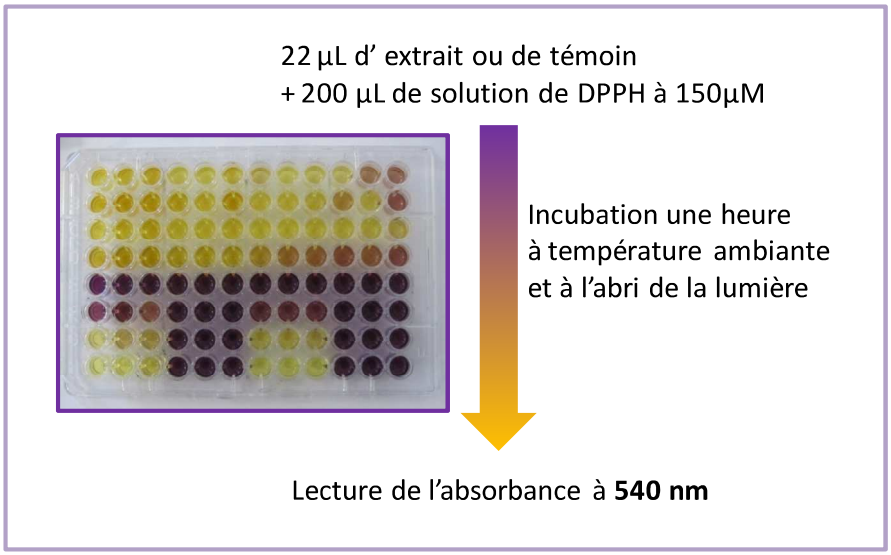


Figure I.38. Protocole résumé du test colorimétrique *in vitro* en microplaques de dosage de l'activité anti-radicalaire des échantillons.

I.6.3.2. Détermination de l'activité antioxydante par la méthode des β-carotène sur microplaque

L'activité antioxydante des extraits et des témoins a été mesurée par la méthode du blanchiment du β-carotène, adaptée pour l'utilisation sur microplaque et modifiée suivant le protocole de Kaur et Kapoor (2002) et Koleva *et al.* (2002) (Figure I.39). Dans cette méthode, l'oxydation de l'acide linoléique en émulsion (Marco, 1968) va entrainer la formation de radicaux, qui en réagissant avec le β-carotène, vont lui faire perdre sa couleur initialement jaune-orangé. 2 mL d'une solution de β-carotène dans du chloroforme (0.1 $mg.mL^{-1}$) sont ajoutés dans un ballon contenant 20 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation au moyen d'un évaporateur rotatif, de l'eau distillée préalablement oxygénée (50 mL) est ajoutée ; et la solution obtenue est agitée afin d'obtenir une émulsion. Ce mélange est ajouté sur microplaque aux 12 µL d'échantillon : c'est à dire d'extrait, de contrôle positif (BHA, BHT, vitamines E et C) ou de témoin négatif (eau distillée ou méthanol) déjà déposés sur la microplaque. L'absorbance de la solution est mesurée immédiatement (t=0 min) à 450 nm au moyen d'un lecteur de microplaques et après 2 heures d'incubation à l'étuve à 50°C (t=120 min). Tous les échantillons sont préparés en triplicat. L'activité antioxydante est exprimée sous forme d'un coefficient (AAC=Antioxydant Activity Coefficient) calculé comme suit (équation) :

$$AAC = \left[\frac{As_{(120)} - Ac_{(120)}}{Ac_{(0)} - Ac_{(120)}}\right] \times 1000 \ (eq.)$$

Avec $As_{(120)}$ l'absorbance du mélange à t=120 min, $Ac_{(120)}$ l'absorbance du témoin négatif à t=120 min et l'$Ac_{(0)}$ l'absorbance du témoin négatif à t=0 min. En partant du principe que les témoins positifs (BHA et BHT par exemple) ont un AAC moyen de 700, nous avons arbitrairement choisi d'exprimer l'activité antioxydante sous forme d'un indice AAC_{700}.

L'AAC_{700} étant alors la concentration d'échantillon nécessaire pour obtenir une valeur d'AAC de 700. Plus l'AAC_{700} est élevé plus l'activité de l'échantillon testé sera faible.

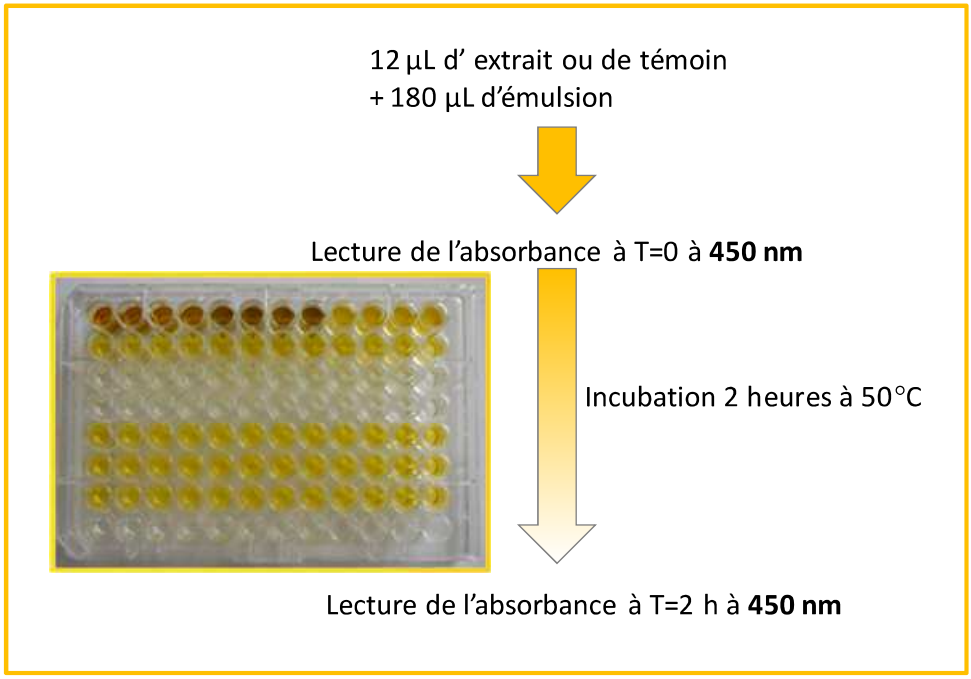


Figure I.39. Protocole résumé du test colorimétrique *in vitro* en microplaques de dosage de l'activité anti-oxydante des échantillons.

NB : Les témoins positifs utilisés pour ces deux tests sont le BHA (2(3)-*t*-Butyl-4-hydroxyanisole, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), le BHT (2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), l'α-tocophérol (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) et l'acide ascorbique (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France).

Nous allons à présent aborder l'étude proprement dite, en nous intéressant dans le deuxième chapitre de ce manuscrit au suivi écologique des deux espèces étudiées.

CHAPITRE II

Extraction des composés phénoliques par procédés éco-respectueux

II.1. Introduction

La première étape mise en œuvre dans un procédé de purification, de fractionnement ou d'identification de molécules bioactives est l'extraction. Celle-ci a pour but la séparation des molécules d'intérêt, en l'occurrence les composés phénoliques de la matrice algale. Le rendement et la sélectivité de l'opération influencent directement le résultat des étapes ultérieures. L'extraction de produits naturels est généralement de type solide-liquide (*cf.* II.2.1.3.Tableau II.1), c'est-à-dire qu'un solide, la matrice algale dans notre cas, est mise au contact d'un liquide : le solvant d'extraction.

Des méthodes dites « classiques » ou « usuelles », comme la macération, l'infusion, la digestion par exemple, étaient jusqu'ici utilisées pour l'extraction de composés naturels. Cependant, ces procédés sont généralement longs, fastidieux et nécessitent de grandes quantités de solvant(s) organique(s).

Des techniques d'extraction alternatives ont fait leur apparition depuis quelques années. Elles peuvent faire intervenir des fluides compressés comme agents extracteurs tels que l'eau ou des mélanges hydroalcooliques dans l'extraction par fluide pressurisé (PLE, Pressurized Liquid Extraction), l'eau seule lors de l'extraction par eau subcritique (SWE, Subcritical Water Extraction) ou le CO_2 dans l'extraction par fluide supercritique (SFE, Supercritical Fluid Extraction). D'autres procédés faisant davantage appel à des principes d'extraction mécaniques peuvent également être utilisés : extraction assistée par micro-ondes (Sparr Eskilsson et Björklund, 2000; Cravotto *et al.*, 2008; Bendahou *et al.*, 2008) ou par ultrasons (Vinatoru *et al.*, 1997). Enfin, d'autres techniques n'ayant pas pour vocation initiale l'extraction proprement dite, font l'objet de recherches actives car elles présentent des atouts permettant de favoriser ou accélérer un processus d'extraction. C'est le cas de l'hydrolyse enzymatique, de l'extrusion réactive ou de l'EPC (Extraction de Partage Centrifuge) par exemple. Ces techniques présentent des avantages liés à la durée, à la sélectivité et au rendement de l'extraction, à l'automatisation et à la combinaison de procédés. Mais elles présentent en particulier l'avantage de réduire les consommations de solvant et/ou d'utiliser des solvants écorespectueux. Elles sont en adéquation avec les principes de base de l'écoextraction (Chemat, 2011) et elles permettent ainsi de s'intégrer dans une démarche de chimie « verte » répondant aux critères de production édictés par les directives européennes REACH et IPPC.

NB : Directives européennes IPPC et REACH

La Convention **IPPC** (**I**ntegrated **P**ollution **P**revention and **C**ontrol) est une convention regroupant un certain nombre de règles adoptées par l'union européenne en 1996 afin de minimiser la pollution émanant de différentes sources industrielles dans toute l'Union européenne. Les exploitants des installations industrielles relevant de l'annexe I de la directive IPPC doivent obtenir une autorisation (autorisation environnementale) des autorités dans les pays de l'Union Européenne. L'objectif principal étant d'obtenir, avant octobre 2007, **un niveau de protection élevée et des performances environnementales efficaces.** La directive IPPC a récemment été codifiée (directive 2008/1/CE).

La directive Européenne **REACH** (**R**egistration, **E**valuation, **A**uthorisation and Restriction of **Ch**emical substances) est une directive européenne, adoptée en décembre 2006, visant à l'enregistrement des substances chimiques utilisées dans l'industrie et dans les produits de consommation courante (hygiène, cosmétiques, parfums...). Toutes les entreprises qui fabriquent, utilisent ou importent des substances chimiques doivent évaluer elles-mêmes la toxicité de ces substances pour les enregistrer auprès de l'Agence européenne des produits chimiques basée à Helsinki. Les matières les plus dangereuses sont progressivement interdites par cette agence, les entreprises étant tenues de **trouver des produits de substitution plus sûrs pour la santé et l'environnement**. REACH a en effet pour objectif d'**éliminer à terme les substances chimiques responsables de différentes pathologies et de cancers**.

Dans ce chapitre, nous allons comparer les performances de différents procédés d'extraction des composés phénoliques chez trois espèces d'algues brunes. Les procédés d'extraction dépendent beaucoup du type de métabolite à extraire et de ses propriétés physico-chimiques, qui pourront guider le choix vers une classe de solvants selon leur polarité par exemple. Parmi les différentes techniques citées précédemment, nous nous sommes intéressés à quatre techniques d'extraction disponibles et pouvant être efficaces pour l'extraction de composés phénoliques : l'extraction de partage centrifuge (EPC) dérivée de la CPC (Chromatographie de Partage Centrifuge), l'extraction par fluide haute pression (PLE et SFE) et enfin une technique alternative peu utilisée pour ces applications : l'extrusion réactive. L'extraction solide/liquide classique a été utilisée comme référence.

II.2. Extraction Solide-Liquide classique

II.2.1. Généralités

L'extraction solide-liquide est l'opération unitaire qui a pour but d'extraire, de séparer ou de dissoudre au contact d'un liquide, un ou plusieurs composants contenus dans un solide. Cette opération est utilisée de manière empirique depuis des siècles pour retirer, de biomasses végétales ou animales, divers produits alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques. Les tannins naturels peuvent être obtenus en utilisant des solvants plutôt polaires : tels que l'eau ou toute autre solution aqueuse, notamment des solutions hydroalcooliques. Ainsi, on peut par exemple, par simple traitement à l'eau, extraire des composés phénoliques de l'écorce de certains arbres, de plantes ainsi que d'algues (Leybros et Frémeaux, 1990). Le procédé d'extraction solide-liquide est donc couramment utilisé dans de nombreuses industries dans les secteurs agro-alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques ou encore en parfumerie et biotechnologies. Il existe de nombreux exemples d'extraction de produits naturels par l'eau, les alcools (tels que l'éthanol ou le méthanol), ou par des solvants organiques tels que les solvants chlorés, l'hexane, le benzène ou le toluène. Enfin, l'extraction solide-liquide peut également être utilisée dans l'industrie de la métallurgie pour séparer le produit utile d'un minerai par dissolution (Leybros et Frémeaux, 1990). Des exemples d'applications de l'extraction solide/liquide dans les domaines de l'agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique et métallurgie sont présentés en Figure II.1.

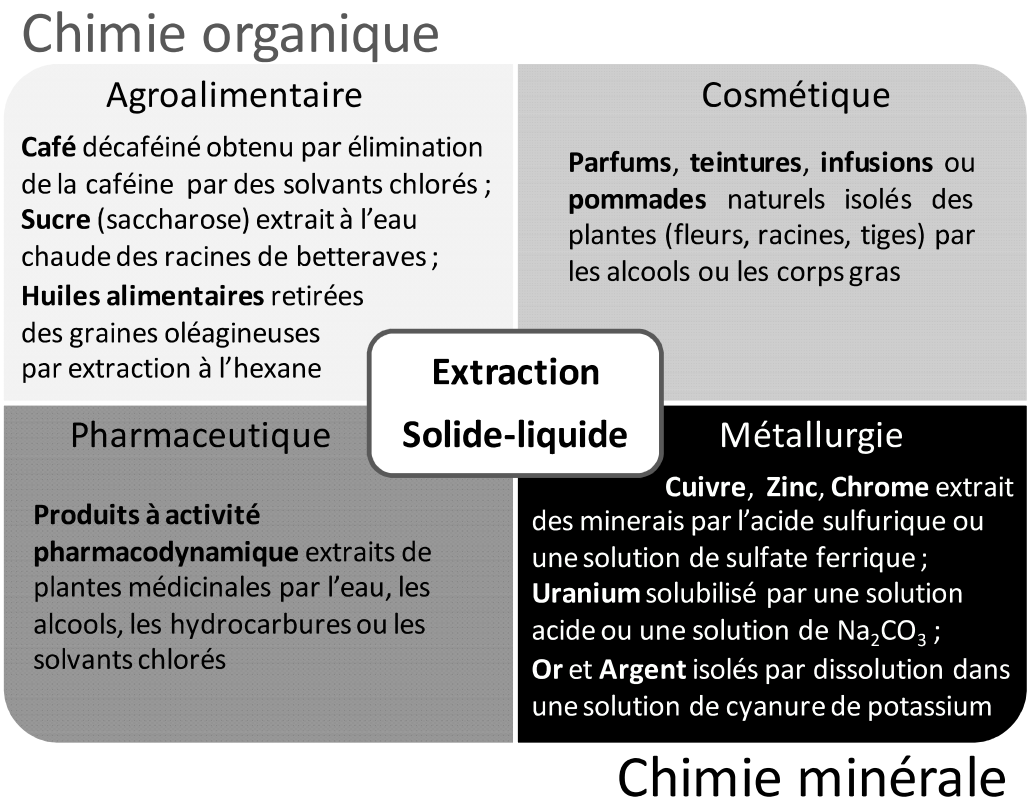


Figure II.1. Exemples d'applications de l'extraction solide-liquide dans l'industrie (d'après Leybros et Frémeaux, 1990)

II.2.1.1. Définitions

L'extraction solide-liquide est une opération de transfert de matière entre une phase solide, la charge contenant le soluté à extraire, et une phase liquide, le solvant d'extraction. Le constituant recherché pouvant être soit le soluté, soit le résidu si le but est d'éliminer les impuretés contenues dans la matrice initiale. Ce procédé est utilisé lorsque les opérations mécaniques ou thermiques ne suffisent pas à l'extraction du produit recherché. En effet, les composés d'intérêts ne sont disponibles pour l'extraction mécanique que dans le cas où le composé à extraire et son substrat ont des propriétés gravimétriques, électriques ou magnétiques très différentes, tandis que leur extraction par voie thermique n'est possible que si le composant retenu dans le substrat est assez volatil et thermorésistant pour être entrainé par la vapeur (Leybros et Frémeaux, 1990).

L'extraction solide-liquide peut être plus ou moins complexe. Ainsi, on pourra trouver des opérations à étage unique ou à simple contact que l'on opposera à des procédés plus complexes à contacts multiples et à courants parallèles. L'opération à étage unique (Figure II.2), bien que généralement incomplète en raison de la valeur élevée du temps de contact nécessaire pour épuiser totalement le solide de son soluté, même avec un très bon solvant et dans des conditions très éloignées de l'équilibre thermodynamique ou de la saturation du solvant, reste la

plus utilisée lors de l'extraction de composés simples. Cette opération peut être discontinue ou fermée en réacteur agité pour les opérations à petite échelle, au laboratoire par exemple, et pour les extractions industrielle simples de produits souvent à faible valeur ajoutée.

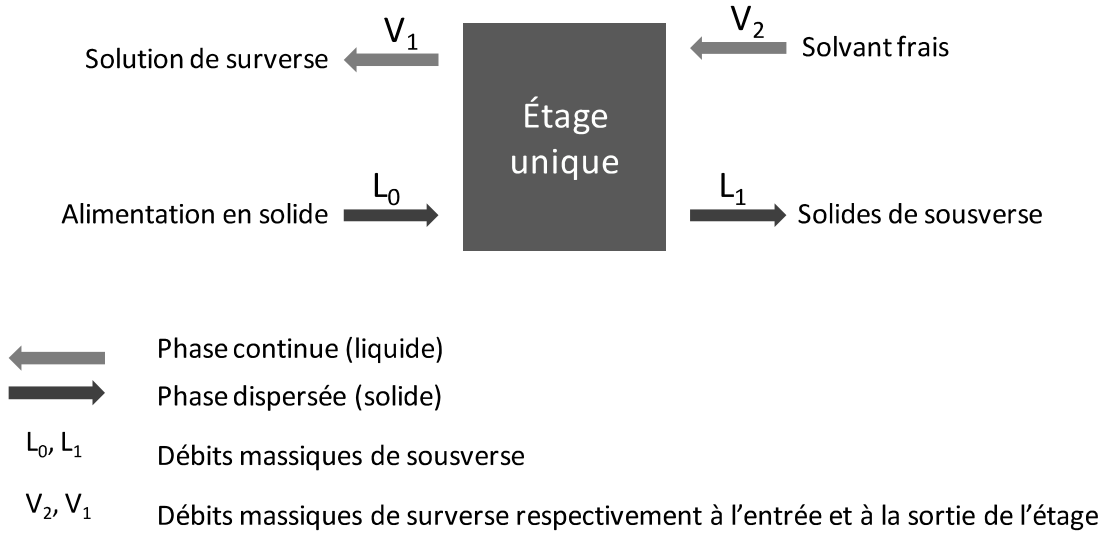


Figure II. 2. Opération d'extraction solide/liquide à étage unique à contre-courant (d'après Leybros et Frémeaux, 1990)

II.2.1.2. Facteurs intervenant dans l'extraction

Lors de tout type d'extraction, solide-liquide notamment, il est important de prêter tout particulièrement attention aux divers facteurs pouvant intervenir dans la qualité de cette opération. Ces facteurs peuvent être liés à l'état du solide et du soluté, à la nature du solvant, à la température, au degré d'agitation des phases, à la concentration résiduelle en soluté dans le solide, à l'humidité et à la durée d'extraction (Figure II.3).

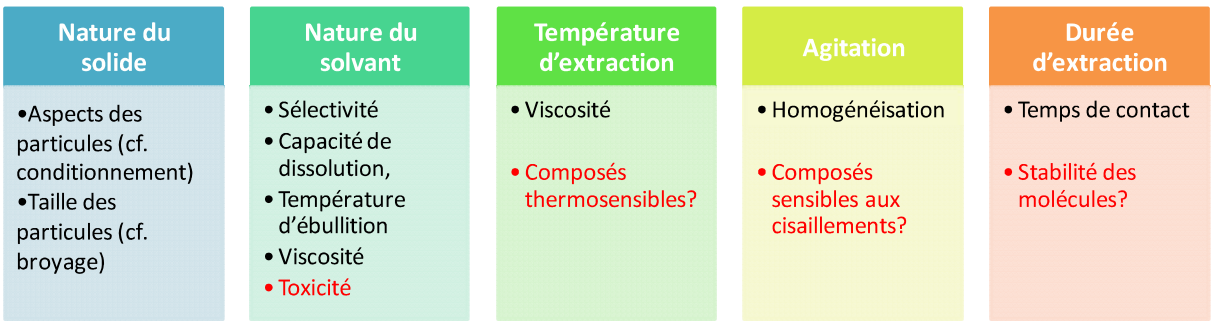


Figure II. 3. Facteurs à optimiser intervenant dans l'extraction solide-liquide.

a) Nature et état du solide et du soluté

Dans un premier temps, il est primordial de s'intéresser à la nature du solide utilisé et du soluté à extraire. En effet c'est bien l'état physique de ces derniers qui va déterminer le mécanisme de transfert de matière lors du processus d'extraction. Les solides à traiter peuvent se présenter sous diverses formes : consistance et taille variées surtout dans le cas de matières premières d'origine végétale (graines, racines, feuilles, thalle chez les algues). Le soluté à extraire est soit un solide, soit un liquide. Il peut être sensible ou non à la chaleur ou à l'oxygène de l'air. Il peut être réparti plus ou moins régulièrement à des teneurs variables dans le solide : dans les matières végétales ou algales, il est généralement enfermé dans des cellules d'où il est extrait par un mécanisme de dialyse ou de diffusion capillaire à travers les parois cellulaires. De ce fait, plus la matière utilisée va être divisée finement et plus la surface d'échange (ou interface) va augmenter permettant ainsi un meilleur accès au soluté et un meilleur rendement. D'un autre côté, un broyage excessif produit un sédiment compact dont il sera difficile de récupérer l'extrait, ce qui rallonge la durée de l'extraction. Il faut donc atteindre le meilleur compromis en accordant une attention toute particulière au conditionnement et la préparation de la matière première avant extraction.

b) Nature du solvant

Le solvant idéal, par définition, doit être sélectif, posséder une grande capacité de dissolution, une température d'ébullition peu élevée, une faible viscosité et être, si possible, non toxique, ininflammable et non explosif. Un bon solvant, sélectif et volatil, fournit des solutions riches en soluté permettant de réduire les coûts des opérations ultérieures d'évaporation et de purification. Le choix d'un solvant à faible viscosité et de masse volumique peu élevée est recommandé pour faciliter la diffusion du solvant, l'agitation et la séparation mécanique. Les principaux solvants utilisés sont l'eau, les alcools (méthanol, éthanol), les hydrocarbures (hexane) et les solvants halogénés. Les solvants chlorés, qui sont moins sélectifs que les hydrocarbures, ont des diffusivités plus élevées. Néanmoins, ils sont en règle générale plus toxiques et plus inflammables. D'autre part, lors de l'utilisation de solvants hydrophobes, la diffusivité est inversement proportionnelle à la teneur en eau du solide (Leybros et Frémeaux, 1990).

c) Température

La température joue également un rôle important lors de l'extraction. En effet, son élévation permet généralement l'accroissement de la solubilité et de la diffusivité du soluté et la diminution de la viscosité de la solution. En revanche, la température utilisée doit être limitée lors de l'extraction de composés thermosensibles, lorsqu'il y a des risques d'extraire des composés nuisibles, ou encore du point de vue de la sécurité de l'installation pour limiter les risques d'incendie (Leybros et Frémeaux, 1990).

d) Degré d'agitation

L'agitation mécanique lors d'une extraction est toujours bénéfique. Elle permet en effet la mise en mouvement des particules dans le solvant, qui permet leur maintien en suspension et l'homogénéisation du milieu. Cependant, il convient d'adapter tout de même la puissance de l'agitation au soluté à extraire ; celui-ci pouvant être sensible aux cisaillements.

e) Durée d'extraction

La vitesse d'extraction est inversement proportionnelle au taux de saturation du solvant. Aussi il est donc important d'utiliser des volumes de solvants suffisants pour ne pas saturer trop rapidement la solution ou de privilégier le mode d'extraction à contre-courant dans le cas d'une extraction en continu. Les performances de l'extraction peuvent être mesurées par un calcul de rendement, de débit ou de sélectivité.

II.2.1.3. Cas des algues et extraction de composés phénoliques

L'extraction solide-liquide reste le procédé le plus utilisé pour l'extraction de composés d'intérêts chez les macroalgues. En effet, sa mise en œuvre facile et peu coûteuse rend ce procédé particulièrement intéressant. De nombreux mélanges de solvants ont été testés pour l'extraction de composés phénoliques de macroalgues (Tableau II.1). Les performances de cette technique restent toutefois discutables, notamment en raison d'une consommation encore élevée en solvant. Il faut souvent chercher un compromis entre pouvoir extracteur et sélectivité, sans laisser de côté la toxicité et l'inflammabilité du solvant (Robles Medina *et al.*, 1998). On utilise classiquement des mélanges de solvants polaires, du type méthanol, acétone, éthanol, eau, dans lesquels les phlorotannins sont solubles. Pour rappel (*cf.* chapitre I), il faut différencier les composés phénoliques solubles de ceux liés aux composants de la paroi. Dans notre étude nous nous attachons aux composés phénoliques solubles et dans leur état natif. Dans la littérature, dans le but de limiter leur dégradation, les composés phénoliques, réactifs avec l'oxygène et photosensibles, sont souvent analysés et caractérisés après acétylation, méthylation ou peracétylation (Singh et Bharate, 2006). Aussi, nos extraits n'étant pas transformés, nous avons pris soin au cours de nos analyses de travailler à l'obscurité et à faible température quand cela était possible.

NB : La dérivatisation (transformation) des composés phénoliques et leur stabilisation permet aussi d'en établir la structure par RMN du proton en milieu organique deutéré alors que les fonctions hydroxyles déprotégées sont échangeables en milieu aqueux, les signaux sont mal résolus et peu séparés et souvent difficiles à observer. De telles transformations préalables seraient utiles pour obtenir des spectres RMN plus nets.

Tableau II. 1. Etude bibliographique des solvants les plus utilisés dans la littérature pour l'extraction solide-liquide de composés phénoliques chez les macroalgues.

Solvant utilisé	Etudes correspondantes
Eau	Matsukawa *et al.,* 1997; Koivikko *et al.,* 2005; Kuda *et al.,* 2005; Wang *et al.,* 2009; López *et al.,* 2011
Méthanol (MeOH)	Nakamura *et al.,* 1996; Nagayama *et al.,* 2002; Koivikko *et al.,* 2005, 2008; Cérantola *et al.,* 2006; Chandini *et al.,* 2008; Ganesan *et al.,* 2008; Shibata *et al.,* 2008; Audibert *et al.,* 2010; Cox *et al.,* 2010; López *et al.,* 2011
Méthanol-Eau (MeOH-Eau)	Arnold et Targett, 1998; Connan *et al.,* 2004, 2006; Koivikko *et al.,* 2005; Cérantola *et al.,* 2006; La lann *et al.,* 2008a, 2012 a et b; Wang *et al.,* 2008; Heo *et al.* 2009; Cox *et al.,* 2010; Fan *et al.,* 2011; Kamiya *et al.,* 2010; López *et al.,* 2011;
Ethanol (EtOH)	Barwell *et al.,* 1989; Matsukawa *et al.,* 1997; Koivikko *et al.,* 2005; Kuda *et al.,* 2005a,b; López *et al.,* 2011;
Ethanol-Eau (EtOH-Eau)	Koivikko *et al.* 2005; ; Kim *et al.* 2006; Keyrouz *et al.* 2011; Parys *et al.,* 2010;
Acétone	Denton *et al.,* 1990; Koivikko *et al.,* 2005
Acétone-Eau	Koivikko *et al.,* 2005, 2008; Wang *et al.,* 2009; Cox *et al.,* 2010; Plouguerné *et al.,* 2012;
Acétate d'Ethyle (AE)	Koivikko *et al.,* 2005

De nombreux autres paramètres peuvent influer sur le rendement d'extraction (Figure II.4). Comme vu au chapitre I, il n'existe pas de protocole « standard » pour l'extraction solide-liquide des composés phénoliques, il est important d'adapter le protocole en fonction de l'espèce choisie et du but recherché (dépendant des applications, ect...) (Matsukawa *et al.*, 1997; Kuda *et al,.* 2005a,b; Wang *et al.* 2009; Cox *et al.,* 2010). Aussi certains auteurs se sont intéressés à l'influence de ces paramètres sur l'efficacité de l'extraction (Tableau II.2). Cependant, parmi les paramètres à étudier, cités plus haut, seule l'influence de la nature de la matière première (ou solide) et du solvant est généralement mesurée. L'effet de la température est très peu étudié et les auteurs emploient le plus souvent des températures avoisinant les 40°C (Tableau II.2). D'autres auteurs, au contraire, préféreront utiliser des températures moins élevées (Tableau II.2) mettant en avant la possible sensibilité des composés phénoliques à la température (Nakamura *et al.,* 1996 ; Nagayama *et al.,* 2002 ; Kubanek *et al.,* 2004 ; Shibata *et al.,* 2008). Ils effectuent alors les extractions à température ambiante proche de 20°C ou encore à des températures très inférieures pouvant descendre à -20°C (Nakamura *et al.,* 1996 ; Kubanek *et al.,* 2004). Inversement, dans de rares études, des températures très élevées pouvant dépasser les 120°C sont employées (Kuda *et al.,* 2005a,b). En ce qui concerne l'agitation, comme dit

précédemment son effet n'est plus à prouver aussi, très peu d'auteurs en font abstraction, celle-ci n'ayant pas d'effet néfaste sur les composés à extraire.

Tableau II. 2. Etude bibliographique des paramètres intervenant dans l'extraction testés par les auteurs afin de trouver les optimums pour l'extraction de CPs actifs à partir de macroalgues. a) Paramètres dont l'effet sur l'efficacité de l'extraction a été étudié, b) températures utilisées par les auteurs et c) durées d'extraction les plus couramment utilisées.

(a)

Effet des paramètres	Etudes correspondantes
Nature du solide	Kubanek *et al.*, 2004; Le Lann *et al.*, 2008a
Nature du solvant	Matsukawa *et al.*, 1997; Koivikko *et al*,. 2005; Kuda et al., 2005a,b; Wang *et al.*, 2009; Cox *et al.*, 2010; López *et al.*, 2011
Température	**Non testé**
Agitation	**Non testé**
Durée d'extraction	**Non testé**

(b)

	Etudes correspondantes
40°C	Connan *et al.*, 2004, 2006; Cérantola *et al.*, 2006; Le Lann *et al.*, 2008a, 2012a,b; Heo *et al.*, 2009; Audibert *et al.*, 2010; Cox *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2011
Ambiante (20-25 °C)	Chandini *et al.*, 2008; Ganesan *et al.*, 2008; López *et al*,. 2011; Wang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Kuda *et al.* 2005a,b
< 5 °C	Nakamura *et al.*, 1996; Nagayama *et al.*, 2002; Kubanek *et al.*, 2004; Shibata *et al.*, 2008

(c)

	Etudes correspondantes
≤ 1h	Matsukawa *et al.*, 1997; Koivikko *et al.*, 2005, 2008; Kuda *et al.*, 2005a,b
2 à 3h	Connan *et al.*, 2004, 2006; Cérantola *et al.*, 2006; Le Lann *et al.*, 2008a, 2012 a,b; Wang *et al.*, 2008; Audibert *et al.*, 2010; Cox *et al.*, 2010; Parys *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2011; López *et al.* 2011;
5 à 20h	Barwell *et al.* 1989; Kuda *et al.* 2005a,b; Keyrouz *et al.* 2011; Plouguerné *et al.* 2012
24h	Arnold et Targett, 1998; Chandini *et al.*, 2008; Ganesan *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009
48h	Nagayama *et al.*, 2002; Shibata *et al.*, 2008

Ainsi le choix du solvant à utiliser, la température d'extraction ainsi que la durée d'extraction sont les paramètres à définir avant des analyses plus poussées. La littérature sur le sujet ne cite pas de protocole standard. Il est donc nécessaire de tester l'effet de chacun de ces paramètres sur l'efficacité de l'extraction.

Concernant les trois espèces d'algues brunes étudiées, nous avons donc recherché l'effet des paramètres suivants (Figure II.4) afin de répondre à la question suivante :

Est-ce que la nature de la matière solide et du solvant, ainsi que la durée et la température d'extraction influent sur la quantité (teneur en composés phénoliques) et la qualité (mesure d'activités biologiques) des composés phénoliques ?

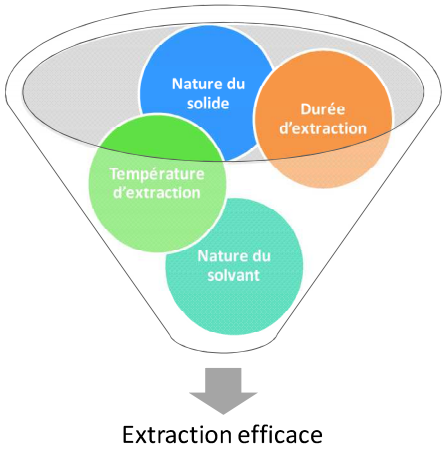


Figure II. 4. Effet des différents paramètres testés sur la qualité de l'extraction

II.2.2. Matériels et méthodes

II.2.2.1. Effet de la nature du solide sur l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques chez trois espèces d'algues brunes

Cette étude comparative a été mise en place sur les trois espèces d'algues brunes suivantes : *Sargassum muticum*, *Ascophyllum nodosum* et *Pylaiella littoralis* récoltées au Dellec au mois de Janvier 2010 (*cf.* chapitre I). Les protocoles utilisés afin d'effectuer les extractions et les dosages (teneur en composés phénoliques, activité antiradicalaire et antioxydante) sont décrits au chapitre I.

a) Effet du conditionnement

Afin d'étudier l'effet de la nature du solide sur la qualité de l'extraction des solutés recherchés, ici les phlorotannins, nous avons mené une étude afin de vérifier si le mode de conditionnement de la matière première, ainsi que sa réduction en poudre par la suite ne dégradait pas les composés phénoliques. Les activités antioxydantes et antiradicalaires des différents extraits ont été mesurées afin de s'assurer de la quantité et de la qualité des composés phénoliques extraits après traitement.

Dans un premier temps afin de mesurer l'effet du conditionnement, nous avons dosé les teneurs en composés phénoliques totaux et les activités antioxydantes associées sur du matériel (Figure II.5) :

- Frais (lot de référence)
- Congelé à -25 °C
- Séché à l'air (les algues sont suspendues à l'air libre dans une salle climatisée à 20 °C)
- Séché à l'étuve à 50 °C
- Séché sur gel de silice (les algues sont placées dans des sacs contenant du Silica Gel renouvelé si nécessaire)
- Lyophilisé

Pour chaque conditionnement, 10 g d'algues fraîches ont été traités juste après récolte et conservés pendant 72h toujours à l'abri de la lumière. Les algues, débarrassée du sel par un rinçage à l'eau douce, sont ensuite broyées (mixeur « à soupe » ou Ultra Turrax pour les algues congelées). L'extraction des composés phénoliques s'effectue à 40°C, sous agitation, à l'obscurité dans 150 mL de MeOH 50% (v/v) pendant 4h. Les teneurs en composés phénoliques sont déterminées sur les extraits après centrifugation (15', 4000 g, 4°C) et filtration sur coton de verre par la méthode de Folin-Ciocalteu (*cf.* chapitre I). En parallèle, les différents extraits ont été analysés en RMN du proton au service RMN de l'UBO après lyophilisation et resuspension dans du Méthanol Deutéré. Toutes les manipulations sont effectuées en triplicat pour l'analyse statistique des résultats.

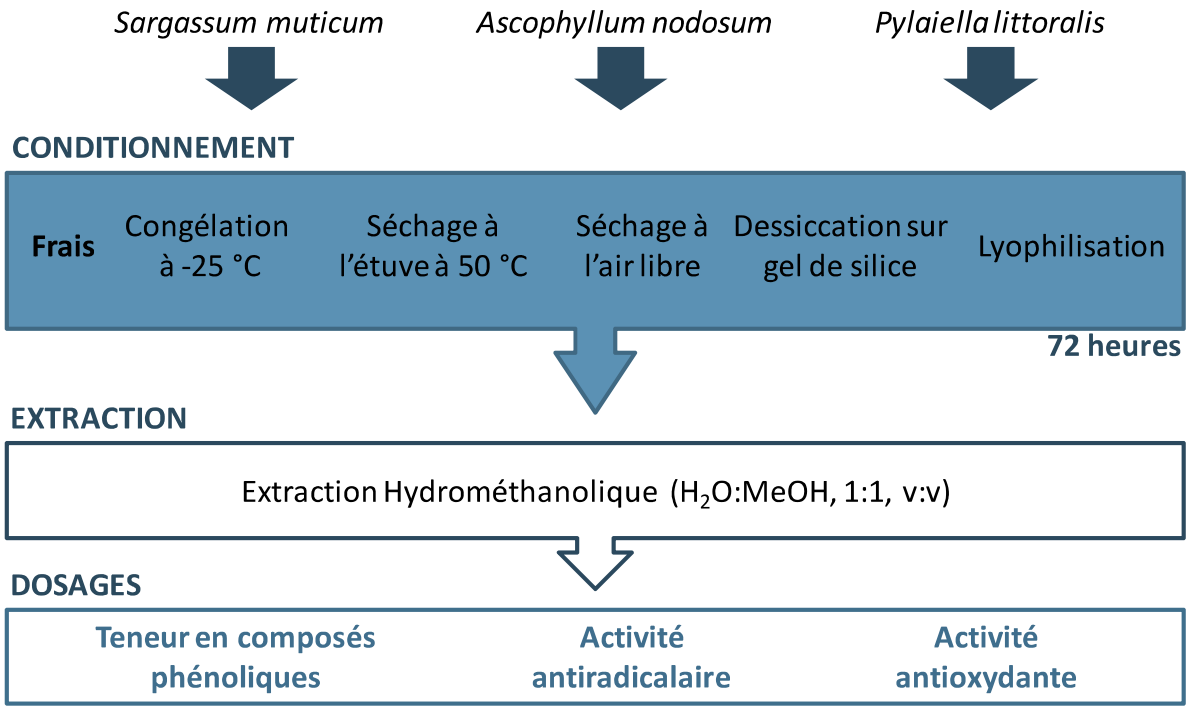


Figure II. 5. Protocole utilisé pour étudier l'effet du conditionnement des algues sur les teneurs en composés phénoliques et les activités antiradicalaires et antioxydantes associées.

b) Effet du broyage

Lors des différentes extractions réalisées sur un même lot de matière première au cours du temps, nous avons remarqué une diminution de la quantité de composés phénoliques dans les extraits réalisés pourtant dans des conditions similaires. Afin de vérifier que la conservation sous forme de poudre permettait de conserver l'intégrité des solutés à extraire nous avons mené une étude comparative sur des extraits provenant d'algues lyophilisées et « fraîchement broyées » comparés à des extraits provenant d'une poudre réalisée longtemps à l'avance. L'évolution dans le temps de la qualité de cette poudre a ensuite été analysée (Figure II.6) : cette étude s'est déroulée sur 2 ans après lyophilisation des algues.

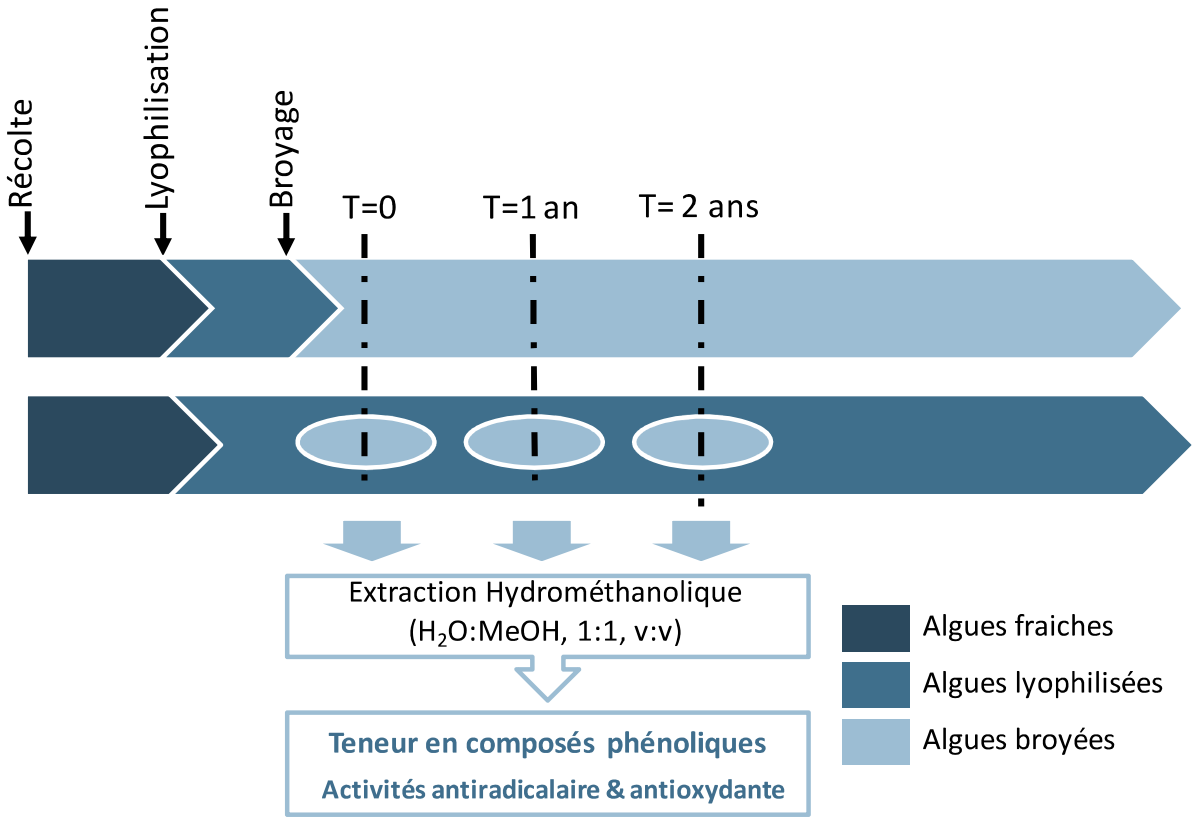


Figure II. 6. Protocole utilisé pour étudier l'effet du broyage des algues sur la conservation de la teneur en composés phénoliques et des activités antiradicalaires et antioxydantes associées.

II.2.2.2. Etude des conditions d'extraction solide/liquide

a) Effet du solvant sur trois espèces d'algues brunes

Il s'agissait d'évaluer l'effet de différents solvants sur l'extraction des composés phénoliques chez trois espèces d'algues brunes. Cette étude comparative a été mise en place sur *Sargassum muticum*, *Ascophyllum nodosum* et *Pylaiella littoralis* récoltées au Dellec au mois de Janvier 2010 (*cf.* chapitre I). Les protocoles utilisés afin d'effectuer les extractions et les dosages (teneur en composés phénoliques, activité antiradicalaire et antioxydante) sont décrits plus haut (*cf.* chapitre I). Les différents solvants testés ont été : l'eau, l'acétone, l'éthanol, le méthanol, l'acétate d'éthyle purs ou dilués (50 :50 v/v) dans de l'eau distillée. En parallèle, les différents extraits ont été analysés en RMN du proton au service RMN de l'Université de Bretagne Occidentale (UBO) après lyophilisation et reprise dans du Méthanol Deutéré ou Acétone Deutéré pour les extraits acétoniques.

b) Etude de l'effet croisé des paramètres solvant, température et durée sur la performance de l'extraction des CP de *Sargassum muticum*

Nous avons vu précédemment l'influence de certains paramètres sur la qualité de l'extraction. Il s'agit ici de comprendre comment agissent, ensemble, les paramètres d'extraction tels que : la nature du solvant, la température et la durée d'extraction sur l'efficacité de l'extraction des CP chez la macrolague brune *S. muticum*. Le protocole d'extraction des phlorotannins est très semblable à celui utilisé classiquement au laboratoire (Chapitre I), il a cependant été miniaturisé (en terme de volumes de solvant et de quantité de biomasse employés) de façon à limiter les volumes de solvants et à faciliter la suite du protocole expérimental. Dans des eppendorfs de 2 mL, 15 mg de poudre sont extraits avec 1 mL du solvant choisi, sous agitation magnétique et à l'obscurité. Les eppendorfs sont disposés dans un bain-marie maintenu à la température souhaitée (Figure II.7). L'extraction dure une à trois heures, puis l'extrait brut est centrifugé à 4000 tours/min pendant 10 min à 4°C et filtré au moyen d'un filtre seringue de 0.45 µm. Ensuite, le surnageant est récupéré et concentré à sec par évaporation rotative (SC110A SpeedVac®, ThermoSavant, Milford, Massachusetts). Le volume est ajusté à 1 mL avec de l'eau distillée. L'extrait brut est ensuite lyophilisé et conservé à l'obscurité. Cette étude comparative a été mise en place sur *Sargassum muticum* récoltée au Dellec (*cf.* chapitre I) au mois de Juillet 2011. Une partie de cette étude a été effectuée dans le cadre du stage de Master 1 de Vic (2012).

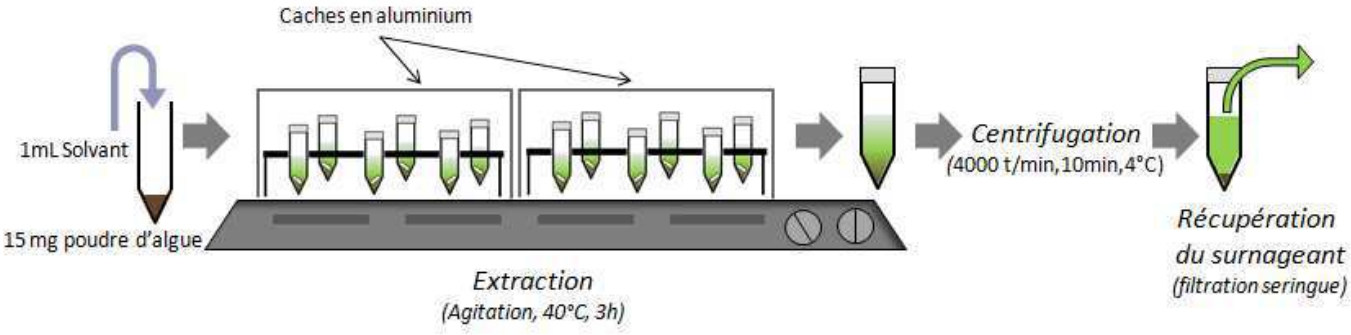


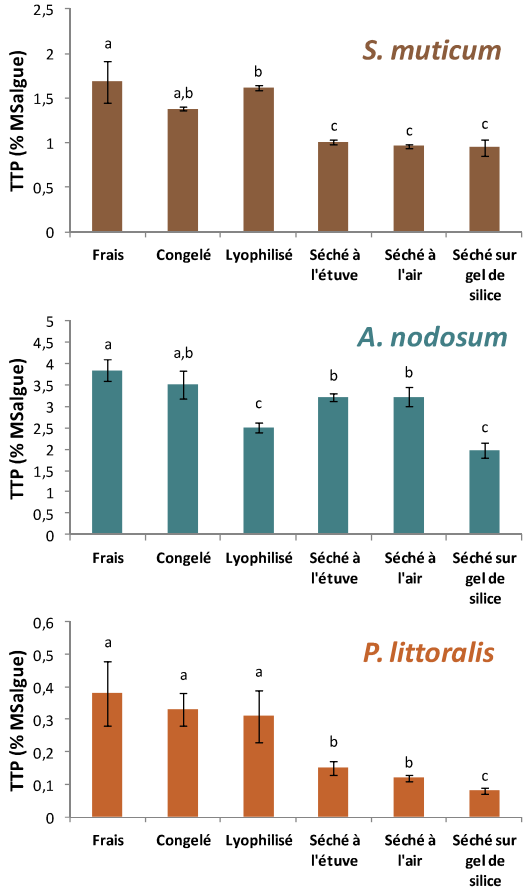
Figure II. 7. Protocole d'extraction miniaturisé : étapes principales de préparation de l'extrait brut en composés phénoliques.

II.2.3. Résultats

II.2.3.1. Effet de la nature du solide

a) Effet du conditionnement sur la qualité de l'extraction de CP chez trois algues brunes

L'effet des différents conditionnements testés sur la quantité de composés phénoliques extraite pour les trois espèces, est présenté sur la figure II.8.



	IC_{50} (mg.mL^{-1})		AAC_{700} (mg.mL^{-1})	
Frais	**1.89 ± 0.03**	(a)	**2.10 ± 0.02**	(a)
Congelé	**1.92 ± 0.03**	(a)	2.32 ± 0.03	(b)
Lyophilisé	**2.02 ± 0.04**	(a)	3.05 ± 0.05	(c)
Séché à l'étuve	4.24 ± 0.05	(c)	4.80 ± 0.10	(e)
Séché à l'air	2.76 ± 0.06	(b)	4.16 ± 0.05	(d)
Séché sur gel de silice	*		5.03 ± 0.15	(f)

	IC_{50} (mg.mL^{-1})		AAC_{700} (mg.mL^{-1})	
Frais	**0.50 ± 0.01**	(a)	**0.74 ± 0.02**	(a)
Congelé	**0.46 ± 0.01**	(a)	**0.80 ± 0.03**	(a)
Lyophilisé	1.25 ± 0.04	(d)	2.03 ± 0.04	(c)
Séché à l'étuve	0.74 ± 0.02	(b)	0.95 ± 0.02	(b)
Séché à l'air	0.88 ± 0.02	(c)	**0.82 ± 0.01**	(a)
Séché sur gel de silice	2.11 ± 0.07	(e)	2.23 ± 0.05	(d)

	IC_{50} (mg.mL^{-1})		AAC_{700} (mg.mL^{-1})	
Frais	**3.32 ± 0.14**	(a)	**4.32 ± 0.15**	(a)
Congelé	4.31 ± 0.12	(b)	*	
Lyophilisé	**3.50 ± 0.07**	(a)	4.84 ± 0.15	(b)
Séché à l'étuve	*		*	
Séché à l'air	*		*	
Séché sur gel de silice	*		*	

Témoins positifs:		
BHA	0.37 ± 0.01	0.45 ± 0.01
BHT	0.38 ± 0.01	0.47 ± 0.01
Vitamine E	0.47 ± 0.01	0.35 ± 0.01

Figure II. 8. Variabilité inter-spécifique des teneurs en composés phénoliques et activités chez trois algues brunes. Partie gauche : Teneurs totales en composés phénoliques (TTP) chez *Sargassum muticum*, *Ascophyllum nodosum* et *Pylaiella littoralis* selon le mode de conservation utilisé (% de MS ; moyenne +/- écart-type). Les groupes correspondent aux résultats de l'analyse statistique (ANOVA, p< 0.05 ; Tukey). Partie droite : activités antiradicalaire et antioxydante associées (mg.mL^{-1} +/- écart-type). Les lettres correspondent aux résultats du test *a posteriori* mené après l'ANOVA (Tukey, p< 0.05). *considéré comme non actif lorsque IC_{50} ou AAC_{700} supérieur à 5 mg.mL^{-1}.

Les trois espèces d'algues brunes ne produisent pas les mêmes teneurs en composés phénoliques (ANOVA, p < 0,001). Pour la condition « algues fraîches », *Ascophyllum nodosum* est l'espèce la plus riche (3.84 ± 0.24% MS_{algue}), suivie de *Sargassum muticum* (1.68 ± 0.23% MS_{algue}) et de *Pylaiella littoralis* (0.38 ± 0,10% MS_{algue}) (Figure II.8).

La quantité de CPs la plus importante se retrouve, pour les trois espèces dans les algues fraîches servant de témoin (Figure II.7). Inversement, la quantité la plus faible se retrouve dans les extraits obtenus à partir d'algues séchées dans le gel de silice (0.95 ± 0.09% MS_{algue}, 1.98 ± 0.19% MS_{algue} and 0.08 ± 0.01% MS_{algue} à P < 0.001, chez *S. muticum*, *A.nodosum* and *P.littoralis*, respectivement). Pour *S. muticum* et *P. littoralis* la teneur totale en composés phénoliques (TTP) semble plus affectée par les séchages à l'air et à l'étuve que pour *A. nodosum* : par exemple, par rapport au témoin frais, chez *S. muticum* ces deux

conditionnements diminuent de 40% la quantité de composés phénoliques extraits, chez *P. littoralis* on observe une diminution de 61% (Figure II.8 gauche), tandis que pour *A. nodosum* seule une diminution de 16% est observée. D'autre part, quel que soit le traitement utilisé avant extraction, les quantités de composés extraits varient énormément d'une espèce à l'autre : *A. nodosum* présente les plus grandes quantités de CPs (supérieure à 3.84% de sa matière sèche) alors que les extraits obtenus à partir de *S.muticum* et *P.littoralis* contiennent respectivement au maximum 1.68 et 0.38% de la MS de l'algue (Figure II.8). Même si les tendances obtenues sont assez différentes suivant les espèces, le traitement par congélation permet d'obtenir des résultats significativement identiques à ceux obtenus sur les algues fraîches ($P < 0.001$). De même, pour *P.littoralis* la lyophilisation permet de conserver une quantité de composés similaire à celle obtenue sur les algues fraîches ($0.31 \pm 0.08\%$ MS_{algue} et $0.38 \pm 0.1\%$ MS_{algue} $P < 0.001$ pour les algues lyophilisées et fraîches, respectivement). Dans le cas de *S. muticum*, la lyophilisation ne permet pas d'obtenir des concentrations en CPs aussi élevées que celles obtenues pour les algues fraîches ($1.62 \pm 0.03\%$ MS_{algue} et $1.68 \pm 0.23\%$ MS_{algue}, $P < 0.001$ pour les algues lyophilisées et fraîches, respectivement). Enfin, chez *A. nodosum*, la lyophilisation entraîne une diminution de 35% de la quantité de composés phénoliques extraits par rapport à celle obtenue avec les algues fraîches (Figure II.8).

Les spectres RMN du proton, présentés ici seulement pour *A. nodosum* plus riche en composés phénoliques, permettent de suivre l'évolution des molécules au cours des différents conditionnements (Figure II.9). Il est intéressant d'observer que les résultats obtenus lors du dosage des CP par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu sont confirmés en RMN. En effet le maximum de composés est extrait après les modes de conditionnements suivant : frais, congelé, séché à l'étuve ou à l'air. Cependant, il faut être prudent quant à l'interprétation des résultats obtenus par RMN. En effet, la RMN ne donne qu'une indication qualitative et doit être considérée avec précautions lorsqu'il s'agit de comparer des quantités. Par exemple, sur l'échantillon frais devant contenir le plus de CP d'après le dosage colorimétrique, les pics sont moins importants que pour le séchage à l'étuve. Cela peut être dû à la quantité plus importante de mannitol dans l'échantillon frais qui masque les signaux propres aux CP.

D'après les résultats du test DPPH, pour *S. muticum* et *P. littoralis* respectivement, l'activité antiradicalaire (IC_{50}) des extraits provenant des algues fraîches (1.89 ± 0.03 et 3.32 ± 0.14 $mg.mL^{-1}$), congelées (1.92 ± 0.03 et 4.31 ± 0.12 $mg.mL^{-1}$) et lyophilisées (2.02 ± 0.04 et 3.50 ± 0.07 $mg.mL^{-1}$) est significativement supérieure ($P < 0.001$) à celle des extraits obtenus à partir d'algues séchées à l'air (2.76 ± 0.06 et supérieur à 5 $mg.mL^{-1}$), à l'étuve (4.24 ± 0.05 et supérieur à 5 $mg.mL^{-1}$) ou sur gel de silice (supérieur à 5 $mg.mL^{-1}$). On remarque également que les extraits de *P. littoralis* obtenus à partir de l'algue séchée à l'air, à l'étuve ou sur gel de silice ne présentent aucune activité antiradicalaire ($IC_{50} > 5$ $mg.mL^{-1}$), de même que pour *S. muticum* séchée sur gel de silice. Quels que soient les traitements utilisés, l'activité antiradicalaire est plus importante chez *A. nodosum*. Ainsi, les tendances observées lors de la mesure de la teneur en CP sont similaires à celles observées pour l'activité antiradicalaire (IC_{50}). L'activité antioxydante, déterminée par le test du blanchiment du β-carotène (AAC_{700}) permet de faire le même constat que pour l'activité antiradicalaire. En effet, l'activité suit les mêmes tendances suivant le

traitement utilisé. Ainsi, pour *S. muticum* et *P. littoralis respectivement*, l'activité antioxydante des extraits provenant des algues fraiches (2.10 ± 0.02 et 4.32 ± 0.15 mg.mL^{-1}), congelées (2.32 ± 0.03 et supérieur à 5 mg.mL^{-1}) et lyophilisées (3.05 ± 0.05 et 4.84 ± 0.15 mg.mL^{-1}) est supérieure ($P < 0.001$) à celle des extraits obtenus à partir d'algues séchées à l'air (4.16±0.05 et supérieur à 5 mg.mL^{-1}), à l'étuve (4.80 ± 0.10 et supérieur à 5 mg.mL^{-1} pour *S.muticum* et *P.littoralis,* respectivement) ou sur gel de silice (5.03 ± 0.15 et supérieur à 5 mg.mL^{-1}). Les tendances observées chez *A.nodosum* sont différentes. En effet, en considérant l'IC_{50} et l'AAC_{700} respectivement, les séchages à l'étuve (0.74 ± 0.02 et 0.95 ± 0.02 mg.mL^{-1}) et à l'air (0.88 ± 0.02 et 0.82 ± 0.01 mg.mL^{-1}) sont plus efficaces que la lyophilisation (1.25 ± 0.04 et 2.03 ± 0.04 mg.mL^{-1}) qui a tendance à diminuer la quantité et la qualité des composés extraits.

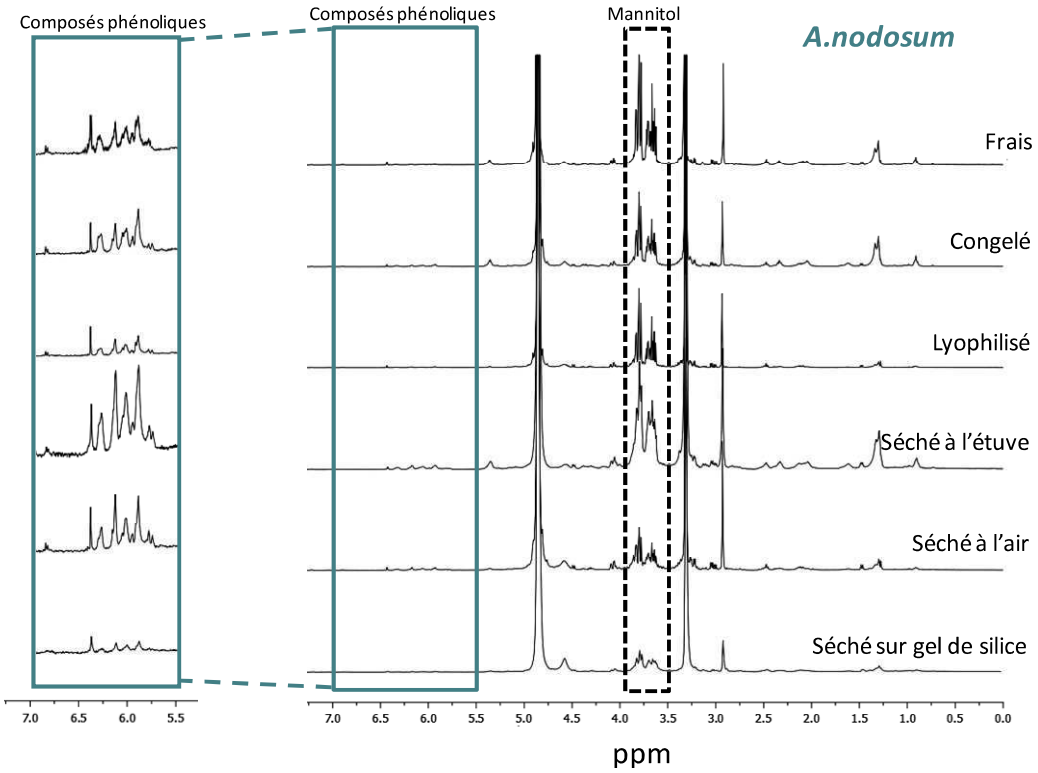
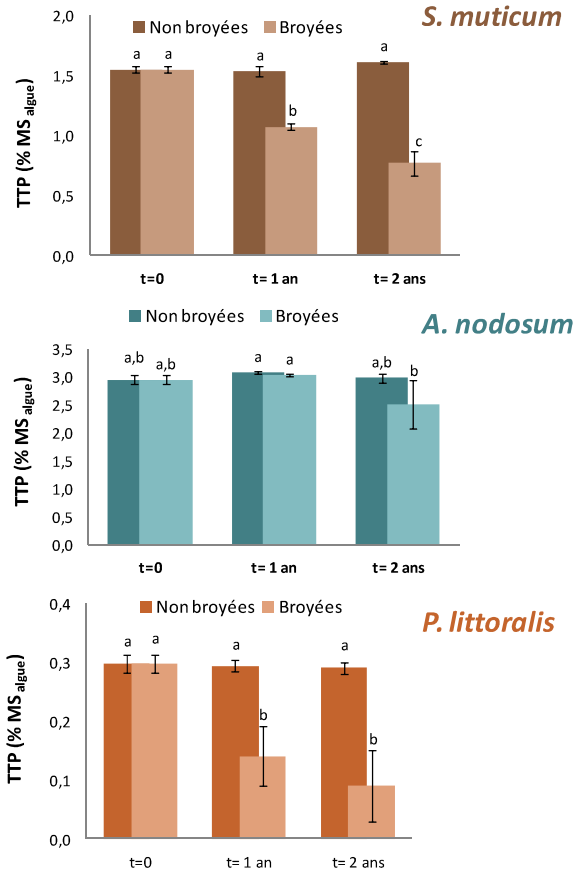


Figure II. 9. Spectres ^{1}H des extraits obtenus pour *A.nodosum* après différents conditionnements (de haut en bas : frais, congélation, lyophilisation, séchage à l'étuve, à l'air et sur gel de silice) dans du solvant MeOD. Un agrandissement de la fenêtre 5.5 à 7 ppm a été effectué à gauche de la figure.

b) Effet du broyage sur la qualité de l'extraction de CP

La figure II.10 présente et compare l'effet d'un broyage des algues 1) suivant immédiatement leur récolte et leur lyophilisation (noté : « Broyées » pour « conservation sous forme broyée ») et 2) l'effet d'un broyage des algues (gardées entières et lyophilisées) juste avant extraction des composés phénoliques (noté : « Non broyées » pour « conservation sous forme non broyée »).



		IC_{50} (mg.mL^{-1})			AAC_{700} (mg.mL^{-1})		
Non broyées	t=0	**1.99 ± 0.03**		**(a)**	**2.91 ± 0.04**		**(a)**
	t= 1 an	2.15 ± 0.05		(a,b)	**2.88 ± 0.03**		**(a)**
	t= 2 ans	2.26 ± 0.05		(b)	2.92 ± 0.02		(a,b)
broyées	t=0	**1.99 ± 0.03**		**(a)**	**2.91 ± 0.04**		**(a)**
	t= 1 an	4.20 ± 0.10		(c)	3.08 ± 0.13		(b)
	t= 2 ans	*			*		

		IC_{50} (mg.mL^{-1})			AAC_{700} (mg.mL^{-1})		
Non broyées	t=0	**0.80 ± 0.05**		**(a)**	**1.52 ± 0.04**		**(a)**
	t= 1 an	**0.78 ± 0.12**		**(a)**	**1.50 ± 0.01**		**(a)**
	t= 2 ans	**0.82 ± 0.03**		**(a)**	**1.52 ± 0.02**		**(a)**
broyées	t=0	**0.80 ± 0.05**		**(a)**	**1.52 ± 0.04**		**(a)**
	t= 1 an	**0.71 ± 0.05**		**(a)**	**1.63 ± 0.15**		**(a)**
	t= 2 ans	**0.77 ± 0.03**		**(a)**	**1.53 ± 0.15**		**(a)**

		IC_{50} (mg.mL^{-1})			AAC_{700} (mg.mL^{-1})		
Non broyées	t=0	**3.50 ± 0.10**		**(a)**	**4.73 ± 0.15**		**(a)**
	t= 1 an	**3.60 ± 0.10**		**(a)**	**4.93 ± 0.12**		**(a)**
	t= 2 ans	**3.73 ± 0.06**		**(a)**	**4.70 ± 0.10**		**(a)**
broyées	t=0	**3.50 ± 0.10**		**(a)**	**4.73 ± 0.15**		**(a)**
	t= 1 an	*			*		
	t= 2 ans	*			*		

Témoins positifs:					
BHA	0.34 ± 0.01		0.40 ± 0.01		
BHT	0.35 ± 0.01		0.43 ± 0.01		
Vitamine E	0.45 ± 0.01		0.32 ± 0.01		

Figure II. 10. Variabilité inter-spécifique des teneurs en composés phénoliques et activités chez trois algues brunes. Partie gauche : Teneurs totales en composés phénoliques (TTP) chez *Sargassum muticum*, *Ascophyllum nodosum* et *Pylaiella littoralis* selon que la biomasse est conservée entière sous forme lyophilisée (« Non broyées ») ou broyée sous forme lyophilisée (« Broyées ») (% de MS ; moyenne +/- écart-type). Les groupes correspondent aux résultats de l'analyse statistique (ANOVA, p< 0.05 ; Tukey). Partie droite : activités antiradicalaire et antioxydante associées (mg.mL^{-1} +/- écart-type). Les lettres correspondent aux résultats du test *a posteriori* mené après l'ANOVA (Tukey, p< 0.05)

On observe un effet néfaste de la réduction en poudre sur le long terme (Figure II.10). En effet, pour *S. muticum* et *P. littoralis*, on observe une nette diminution de la quantité de composés phénoliques obtenus lors de l'extraction lorsque les algues ont été conservées sous forme de poudre juste après leur lyophilisation (Figure II.10 gauche). Ainsi, pour *S. muticum* on observe une diminution de 31% au bout d'un an de conservation par rapport au t=0 (1.55 ± 0.03 et 1.07 ± 0.03 $\%MS_{algue}$ à t=0 et t=1 an respectivement) et de 50% au bout de 2 ans (1.55 ± 0.05 et 0.77 ± 0.15 $\%MS_{algue}$ à t=0 et t=2 ans respectivement). Pour *P. littoralis*, on peut faire le même constat, une diminution de 53% est observée au bout d'un an (0.30 ± 0.02 et 0.14 ± 0.01 $\%MS_{algue}$ à t=0 et t=1 an respectivement) et on perd jusqu'à 70% au bout de 2 ans (0.30 ± 0.02 et 0.09 ± 0.01 $\%MS_{algue}$ à t=0 et t=2 ans respectivement). Pour *A. nodosum* en revanche, seule une très faible diminution de 15% de la quantité de composés extraits est observée au bout de 2 ans (2.94 ± 0.08 et 2.50 ± 0.44 $\%MS_{algue}$ à t=0 et t=2 ans respectivement).

En ce qui concerne les activités antiradicalaires (ACC_{700}) et antioxydantes (IC_{50}), celles-ci varient également selon le délai dans le broyage des algues (longtemps à l'avance ou juste avant l'extraction). On n'observe aucune variation d'activité dans le temps pour les extraits provenant des algues maintenues non broyées jusqu'à l'extraction ($p<0.001$). En revanche, à partir d'un an de conservation, pour *S. muticum* et *P. littoralis*, on observe une chute des activités antiradicalaires pour les extraits provenant des algues conservées sous forme de poudre. Ainsi, pour *S. muticum* on observe une diminution de 52% au bout d'un an de conservation par rapport au t=0 (1.99 ± 0.03 et 4.20 ± 0.10 $mg.mL^{-1}$ à t=0 et t=2 ans respectivement). Au bout de deux ans de conservation, toujours pour ces deux mêmes espèces, les extraits perdent totalement leurs activités (antiradicalaire et antioxydante : IC_{50} et AAC_{700} supérieurs à 5 $mg.mL^{-1}$). Chez *A. nodosum*, comme pour la quantité de composés phénoliques, les activités ne diminuent pas significativement ($p<0.001$) suivant le protocole de broyage employé.

II.2.3.2. Etude des conditions d'extraction solide/liquide

a) Effet du solvant

L'effet du solvant sur la teneur en composés phénoliques des extraits a été testé pour les trois espèces d'algues brunes (Figure II.11) lyophilisées et réduites en poudre. La nature du solvant ainsi que l'espèce considérée influencent fortement la teneur totale en composés phénoliques (ANOVA, $p < 0.001$ pour les deux facteurs 'espèce' et 'solvant'). De plus, une interaction 'espèce*solvant' est visible démontrant que pour une espèce donnée, la teneur en composés phénoliques varie en fonction du solvant ($p < 0.001$).

Le solvant le plus efficace n'est pas le même selon l'espèce considérée. Ainsi, pour *S. muticum*, la quantité maximale de CP est obtenue grâce à un mélange acétone-eau 50 :50 (v/v) (2.91 ± 0.03 $\%MS_{algue}$). Pour *A. nodosum,* un mélange acétone-eau 50 :50 (v/v) ou un mélange méthanol-eau 50 :50 (v/v), permet d'obtenir des extraits riches en composés phénoliques (3.00 ± 0.44 ou 3.00 ± 0.10 $\%MS_{algue}$ pour le mélange acétonique ou méthanolique respectivement). Enfin, pour *P. littoralis*, le solvant le plus efficace est un mélange acétate d'éthyle-eau 50 :50 (v/v) (2.57 ± 0.27 $\%MS_{algue}$). Les solvants les moins efficaces sont, pour *S. muticum* et *A. nodosum*, l'eau seule (0.57 ± 0.08 et 0.80 ± 0.06 $\%MS_{algue}$ pour *S. muticum* et *A. nodosum* respectivement) alors que pour *P. littoralis* l'éthanol ou le méthanol purs (0.29 ± 0.02 ou $0.26 \pm 0.03\%MS_{algue}$ respectivement) ne sont pas efficaces. On remarque également que suivant les espèces l'influence du solvant est plus ou moins importante. Ainsi chez *S. muticum*, à part le mélange AE-eau et l'eau seule, tous les solvants permettent d'extraire plus de 1.5% de CP par rapport à la matière sèche de l'algue. L'interaction entre l'espèce et le solvant est importante ici ($p<0.001$), malgré tout, toutes espèces confondues c'est l'acétone-eau qui permet l'extraction la plus efficace en terme de quantité de composés extraits.

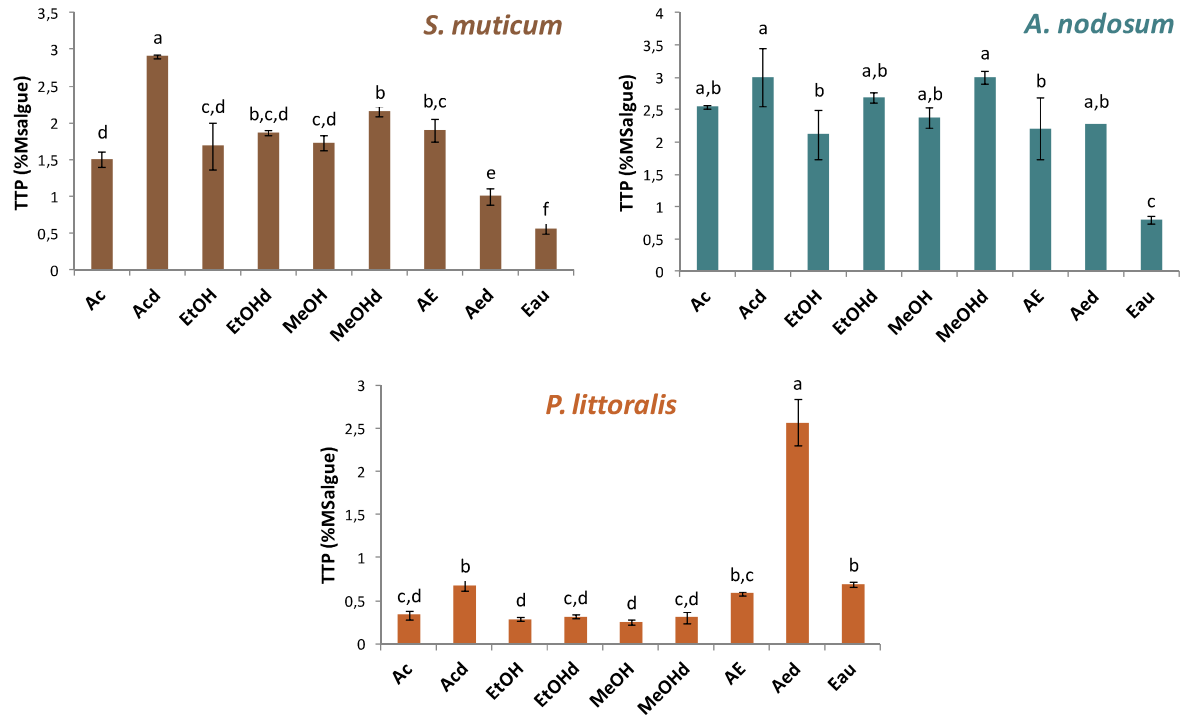
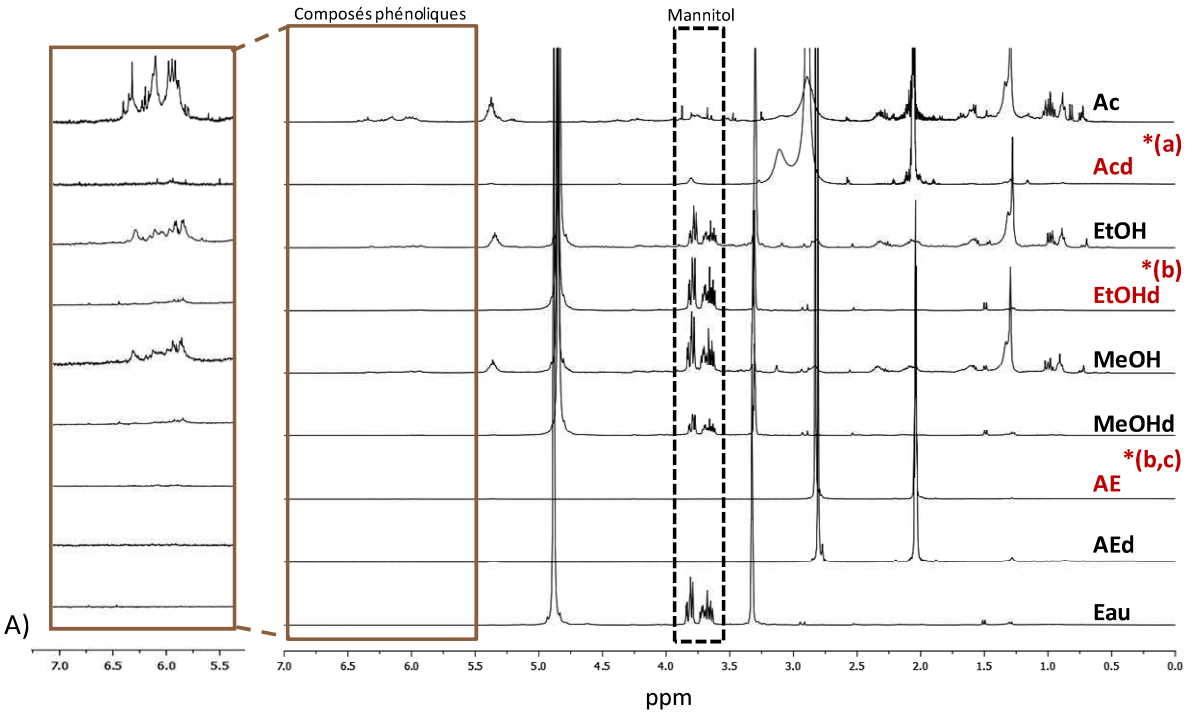
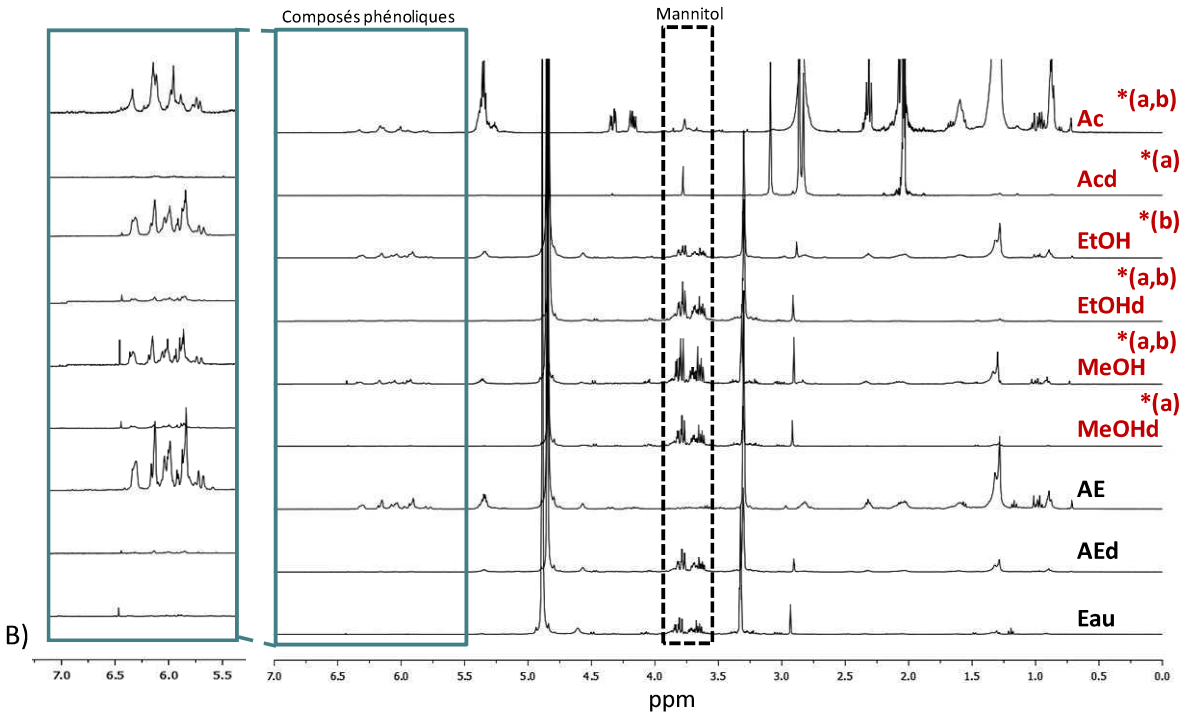


Figure II. 11. Teneurs en composés phénoliques chez les trois algues brunes *Sargassum muticum*, *Ascophyllum nodosum* et *Pylaiella littoralis* selon le solvant d'extraction utilisé (% de MS ; moyenne +/- écart type). Les lettres correspondent aux résultats du test *a posteriori* (ANOVA, p< 0.05 ; Tukey). Ac: Acétone, Acd: Acétone-Eau 50:50 (v:v); EtOH: Ethanol, EtOHd: Ethanol-Eau 50:50 (v:v); MeOH: Méthanol, MeOHd: Méthanol-Eau 50:50 (v:v); AE: Acétate d'éthyle, AEd: Acétate d'éthyle-Eau 50:50 (v:v).

Les spectres RMN présentés en figure II.12 nous donnent une information supplémentaire sur la qualité des fractions obtenues. Le dosage de Folin-Ciocalteu permet d'estimer la quantité de composés phénoliques extraite rapportée à la masse de matière initiale d'algues lyophilisées. Ici, les spectres permettent d'avoir une idée de la composition de la fraction obtenue. Ainsi quelle que soit l'algue considérée, d'après les spectres RMN, les solvants qui produisent des fractions contenant le plus de composés phénoliques ne sont pas ceux permettant l'extraction d'un maximum de CP à partir de l'algue. Les fractions obtenues pour *S. muticum* par exemple avec l'acétone pure (Figure II.12) semblent, d'après les spectres, contenir plus de CP que dans les fractions obtenues grâce à un mélange acétone-eau par exemple. Cela peut s'expliquer par le fait que les extraits à l'acétone diluée contiennent d'avantage de composés différents et en grande quantité ce qui pourrait masquer les signaux des CP sur les spectres RMN. Le même constat peut être fait pour deux autres espèces *A nodosum* et *P. littoralis* (Figures II.12 B et C).


Composés phénoliques
Mannitol
Ac
*(a)
Acd
EtOH
*(b)
EtOHd
MeOH
MeOHd
*(b,c)
AE
AEd
Eau
A)
ppm


Composés phénoliques
Mannitol
*(a,b)
Ac
*(a)
Acd
*(b)
EtOH
*(a,b)
EtOHd
*(a,b)
MeOH
*(a)
MeOHd
AE
AEd
Eau
B)
ppm

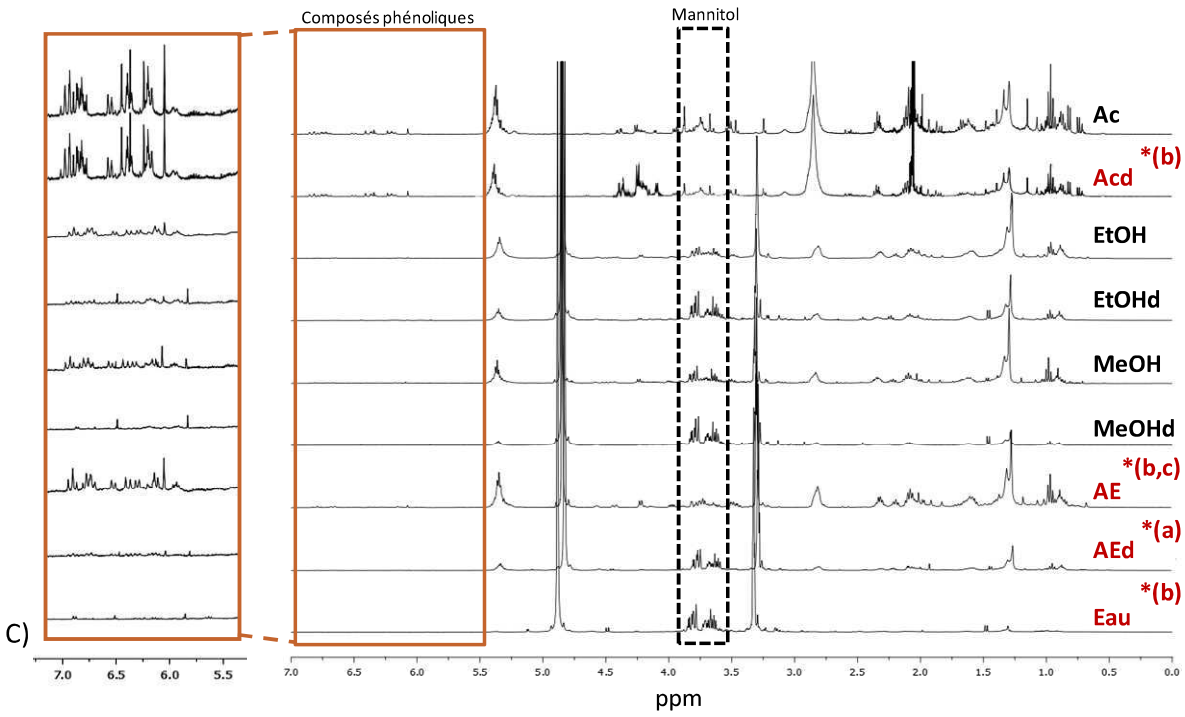


Figure II. 12. Spectres ^{1}H RMN des extraits obtenus pour *Sargassum muticum* (A), *Ascophyllum nodosum* (B) et *Pylaiella littoralis* (C) avec les différents solvants testés (de haut en bas : Ac: Acétone, Acd: Acétone-Eau 50:50 (v:v); EtOH: Ethanol, EtOHd: Ethanol-Eau 50:50 (v:v); MeOH: Méthanol, MeOHd: Méthanol-Eau 50:50 (v:v); AE: Acétate d'éthyle, AEd: Acétate d'éthyle-Eau 50:50 (v:v)). Agrandissement de la fenêtre 5.5 à 7 ppm à gauche de chaque figure. Les solvants notés en rouges, pour rappel, sont les plus efficaces pour l'extraction de CP d'après la Figure II.10). Les lettres correspondent aux résultats du test *a posteriori* (ANOVA, p< 0.05 ; Tukey).

b) Effet croisé du solvant, température et durée d'extraction (S/Tps/T°C) sur la teneur en composés phénoliques des extraits de *Sargassum muticum*

Les résultats de l'étude de l'effet des conditions d'extraction (solvant, température et durée) sur la quantité de phlorotannins extraits de l'algue brune *Sargassum muticum* ont été présentés lors du congrès international Alg'N'Chem (novembre 2011) et sont rassemblés dans un manuscrit soumis à la revue «*Journal of Applied Phycology*», sous la référence suivante:

"Optimisation of the solvent, temperature and duration of the extraction procedure of phlorotannins monitored by in vitro colorimetric tests and ^{1}H NMR analysis in the brown macroalga *Sargassum muticum*"

Tanniou Anaëlle, Vic Léo, Kervarec Nelly, Vandanjon Laurent, Bourgougnon Nathalie, Stiger-Pouvreau Valérie

Le manuscrit, rédigé en langue anglaise et incluant différentes figures et tableaux, est présenté pages suivantes.

En résumé, dans le but d'optimiser le protocole d'extraction solide-liquide classiquement utilisé au laboratoire pour extraire les composés phénoliques des macroalgues, il s'agissait d'étudier le rôle des paramètres d'extraction (nature du solvant, température et durée d'extraction) sur la sélectivité et la productivité du procédé. Cette étude, menée sur l'algue brune *Sargassum muticum*, devait permettre de déterminer la meilleure combinaison de paramètres solvant, durée et température pour l'extraction de composés phénoliques actifs. Dans ce but, cinq solvants (Acétone, Ethanol, Méthanol, Acétate d'éthyle purs ou dilués et eau), trois durées d'extractions (1, 2 ou 3 heures) et trois températures (20, 40 et 60°C) ont été testés. Le choix de la meilleure combinaison de paramètres d'extraction s'est fait sur la base de plusieurs mesures : teneur totale en composés phénoliques (TTP) mesurée par le test colorimétrique de Folin-Ciocalteu et contrôlée par des analyses RMN. Les activités antiradicalaires et antioxydantes ont été évaluées respectivement par les tests du DPPH et la méthode du blanchiment du ß-carotène. La relation entre TTP, les propriétés antioxydantes et les conditions d'extraction sont ici discutées. Sans tenir compte du solvant utilisé, la température d'extraction la plus efficace est 40°C et la durée d'extraction peut être réduite à 2 h sans modifications significatives de la quantité et de la qualité des composés extraits. Trois des solvants testés sont particulièrement prometteurs et peuvent être utilisés préférentiellement suivant le but recherché. Tout d'abord, le mélange acétone-eau (v/v) a permis la meilleure extraction de CP : jusqu'à 5.92 ± 0.15 % MS_{algue}. Ensuite, l'acétone seule a permis d'obtenir les rendements les plus importants, une fraction riche en CP (51.96 ± 2.33 $\%MS_{fraction}$) et l'activité antiradicalaire la plus importante (0.29 ± 0.01 mg/ml pour l'IC_{50}). Finalement, l'éthanol permet une extraction efficace de CP actifs (0.54 ± 0.10 mg/ml pour l'IC_{50}) tout en répondant aux exigences des normes européennes pour la valorisation éventuelle de *S. muticum.*

Optimisation of the solvent, temperature and duration of the extraction procedure of phlorotannins monitored by *in vitro* colorimetric tests and ^{1}H NMR analysis in the brown macroalga *Sargassum muticum*

Tanniou Anaëlle [1], Vic Léo [1], Kervarec Nelly [2], Vandanjon Laurent [3,4], Bourgougnon Nathalie [4], Stiger-Pouvreau Valérie [1]

[1] Université de Bretagne Occidentale (UBO), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), LEMAR UMR 6539, Technopôle Brest-Iroise, Rue Dumont d'Urville, Plouzané, France 29280 (anaelle.tanniou@univ-brest.fr)

[2]Service RMN-RPE, UFR Sciences et Techniques, Université de Bretagne Occidentale (UBO), Avenue Le Gorgeu, 29200 Brest, France

[3]Université de Nantes, Laboratoire GEPEA (UMR CNRS 6144), CRTT, 44602 Saint-Nazaire, France

[4]Université de Bretagne-Sud, 56321 Lorient, France

Abstract

A simple method for extracting *Sargassum muticum* bioactive phenolic compounds (PC) is the solid/liquid extraction, which is classically used in laboratory. In order to improve the selectivity and the productivity of this process, several parameters were tested to look at their role on the extraction efficiency. Five solvents (Acetone, Ethanol, Methanol, Ethyl acetate and pure or diluted water), three extraction durations (1, 2 or 3 hours) and three temperatures (20, 40 and 60 °C) were tested. The choice of the best parameters combination was based on several measurements: the total phenolic content (TPC) measured by the colorimetric Folin-Ciocalteu assay and controlled by ^{1}H NMR analysis, together with the radical scavenger and antioxidant activities, assessed respectively by the DPPH assay and β-carotene bleaching method. Relationships between TPC, antioxidant properties and extraction conditions are discussed. Irrespective of the used solvent, the most effective extraction temperature was 40°C and the extraction duration can be reduced to 2 h without significant modifications in PC quantity and quality. Three solvents could be preferentially used according to the purpose. Acetone-water mixture allowed the better PC extraction: up to 5.92 ± 0.15 $\%DW_{algae}$ when pure acetone afforded the most important yields in concentrated PC (51.96 ± 2.33 $\%DW_{fraction}$) and the better radical scavenger activities (0.29 ± 0.01 $mg.mL^{-1}$ for IC_{50}). Finally, ethanol allowed a good active PC extraction (0.54 ± 0.10 $mg.mL^{-1}$ for IC_{50}) and potentially complies European norms requirements for the prospective valorization of *S. muticum* using green processes and permitting a sustainable management of populations.

Keywords: *antioxidant activities; phenolic compounds; solid/liquid extraction; combination temperature/duration/solvent; Sargassum muticum*

1. Literature survey

Phenolic compounds (PC) in brown algae, also called phlorotannins are secondary defense metabolites synthesized during development as components of algal cell-walls or as chemical defense in response to abiotic and biotic stress conditions, such as UV radiation, grazing, bacterial infection and epiphytism, as well as in intra- and interspecific communication (Koivikko *et al.* 2005; Plouguerné *et al.* 2006; Bourgougnon and Stiger 2011). As these compounds are produced in response to the production of reactive oxygen species (ROS), PC exhibits antiROS, i.e. antioxidative properties (Nakai *et al.* 2006; Kuda *et al.* 2007; Kumar Chandini *et al.* 2008). Structurally, phlorotannins are oligomers and polymers of 1,3,5-trihydroxybenzene (phloroglucinol) (Targett and Arnold 2001) and can be considered as a pool composed by PC of different nature and/or polarity. In the last few years, natural antioxidants from plant and animal sources are actively investigated as replacements for synthetic antioxydants currently used as food additives. Conventional solvent solid/liquid extraction is frequently used to extract bioactive compounds from algae (Le Lann *et al.* 2008; Wang *et al.* 2009; López *et al.* 2011; Le Lann *et al.* 2012).

For many years, the effects of different extracting solvents have been tested for the extraction of polyphenols from algae and plant material (Pinelo *et al.* 2004). There is no standardized protocol for the PC extraction, as each species produces different chemically structured phenolic compounds. It is then necessary to adapt the method for every studied model (Wang *et al.* 2009). The choice of the solvent will depend on the extracted compounds polarity. Thus, extraction efficiency will be dependent on the solvent and the method of extraction (Hayouni *et al.* 2007). Solvents can be used pure or diluted, which conducted researchers in testing a large variety of solvents for the extraction of such compounds in the literature (Koivikko *et al.* 2005; Lopez *et al.* 2011), the most found being aqueous methanolic (Connan *et al.* 2006; Chandini *et al.* 2008; Fan *et al.* 2011), acetonic (Koivikko *et al.* 2005; Wang *et al.* 2009; Plouguerné *et al.* 2012) and ethanolic mixture more recently (Audibert *et al.* 2010; Keyrouz *et al.* 2011).This can be explained by the growing interest in obtaining eco-extracts prefered (almost imposed) in the food or cosmetic industry and thus complies norms requirements. Solid-liquid extractions are often time-consuming, with durations are often fixed at 2 or 3 hours (Audibert *et al.* 2010; Fan *et al.* 2011; Lopez *et al.* 2011) but sometimes achieved within 48h (Nagayama 2002). However, conversely to literature on terrestrial biomasses like fruits or higher plants (Pompeu *et al.* 2009; Kukula-Koch *et al.* 2013), at this date, no publication explains why these extraction conditions were used for macroalgae. This study was then focused on minimum extraction duration necessary to obtain rich PC extracts. Indeed, for extractions

made in a simple agitated reactor, the necessary time was in range of hours while other processes allow to drop bellow some minutes (Tanniou *et al.* 2013a). The extraction temperature was also studied as it is known that it influences strongly the extraction efficiency (Plaza *et al.* 2010; Rodríguez-Meizoso *et al.* 2010). However, high temperatures could engender an additional cost for the industry if an important heating is necessary. Thus, it was important to find the minimum temperature to obtain rich extracts without a degradation of their activity. The objective of this study was then to investigate the cross effect of three extracting parameters, i.e. solvent, extraction duration and temperature, on the total phenolic content and activities of the crude extracts derived from *S. muticum*.

Sargassum muticum (Yendo) Fensholt was chosen as a model organism to carry out these assays. This introduced brown macroalga native from Japan has widely spread along the French Atlantic coasts and is currently one of the most accessible Sargassaceae species on the French Brittany shores. This large sustainable biomass could represent a viable biotechnological asset in the regional resource development programs. Moreover this species is known to produce interesting phenolic compounds of low molecular weight (lower than 2 KDa) (Le Lann *et al.* 2012) which can be extracted and purified more easily than bigger polymers and having already demonstrated biological activities such as antifouling and antioxidant ones (Le Lann *et al.* 2008; Tanniou *et al.* 2013a). The potential represented by *S. muticum* led us to carry out a study aimed at selecting the best Solid-Liquid extraction conditions, i.e. which could maximize yield while minimizing the denaturation and the loss of original properties, of the polyphenols of interest. More specifically, we need: (i) to control and validate the quantity and the quality of PC extracted by each process (Folin and NMR profiles), (ii) to control that active extracts are not lost during the process and finally (iii) to discriminate the best extraction conditions (Solvent-Duration-Temperature combination) by taking into account quality and quantity of obtained PC.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Thalli of *Sargassum muticum* were collected in July 2011 at the Dellec (Plouzané), a semi-exposed field site on the western coast of Brittany (France). This month was chosen because phenolic-rich thalli of *Sargassum muticum* are best collected in summer (Plouguerné *et al.* 2006; Le Lann *et al.* 2012).

During collection, only the apical and median parts of the thalli were retained and the holdfast was left in place to allow regrowth and thus minimize collecting impact. Immediately after collection and epiphytes removal, thalli were washed, first with filtered seawater then with distilled water in order to get rid of residual sediments and salts. The cleaned algal materials were then surface dried with blotting paper towel, chopped into fragments, freeze-dried, powder reduced with a Waring Blender and finally sieved at 250 µm. This conditioning procedure was chosen as it generated high phenolic content and the maintaining of activity, especially in *S. muticum* (Le Lann *et al.* 2008).

2.2. Solid/liquid extraction of phenolic compounds

15 mg (DW) of finely ground algal material was placed in 2 mL eppendorf tubes, and extracted using 1 mL of the following solvent mixtures with increasing polarity: Ethyl Acetate (EA), Ethanol (EtOH), Acetone (Ac), Methanol (MeOH) and deionized water; these solvents were used pure (100%) or diluted (50%) (v/v in deionized water). Each preparation was left under stirring at the chosen temperature during the fixed duration in the dark. The mixtures were then centrifugated using an Eppendorf 5810 R centrifuge (Eppendorf A.G., Hamburg, Germany) at 4000 *g* for 10 min at 4°C. The supernatants were then filtered with 0.45 µm syringe filters and concentrated to dryness under reduced pressure at 40°C using a speed vacuum concentrator (SC110A SpeedVac®, ThermoSavant, Milford, Massachusetts). About 1 mL of Milli-Q water was then added to each residue to give the crude extract. All extracts were then freeze-dried prior to further analyses (phenolic content quantification, bioassays and NMR analyses). All the extracts were prepared in triplicate.

In this experiment, phenolic compounds in *S. muticum* were then extracted by using (1) different extraction solvents (see above) during (2) three different extraction times: 1, 2 or 3 hours at (3) three extraction temperatures: room temperature (20°C), 40°C and 60°C.

2.3. Determination of the Total Phenolic Contents and Folin-Ciocalteu assay

The total phenolic content of all extracts was colorimetrically (Labsystems, Multiskan MS, Finland) determined with a microplate adapted Folin–Ciocalteu assay (Sanoner *et al.* 1999), which is known to be less affected by interfering compounds; these last substances, however, are thought to account for less than 5% of the Folin–Ciocalteu-reactive compounds in brown seaweeds (Toth and Pavia 2001). Phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was used as a standard, and concentrations were determined in each extract by freeze-drying three aliquots of 1 mL. Total phenolic contents (TPCs) were expressed as percentages of phenolic compounds per dry weight (DW) in the aliquot.

2.4. Activity measurements of extracts

2.4.1. DPPH radical scavenging assay

The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay modified according to (Le Lann *et al.* 2008) was used to determine the radical scavenger activities in extracts. Ascorbic acid (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), α-tocopherol (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), butylated hydroxyl-anisole (BHA), butylated hydroxyl-toluene (BHT) (respectively 2(3)-*t*-Butyl-4-hydroxyanisole and 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) were used as positive controls. The protocol was microplate adapted for a faster use and to decrease sample preparation time. Briefly, various dilutions of the extracts were prepared in triplicate before the addition to 12 µL aliquots of 150 µM of DPPH radical (222 µL). The mixture was stored in the dark for 60 min prior to absorbance measurement at 540 nm. Distilled water was used as a negative control. All samples were assayed in triplicate. Radical

scavenging activity was expressed as IC_{50} (the concentration of substrate that causes a 50% loss of the DPPH activity). Furthermore, the lower the IC_{50}, the stronger the antioxidant activity was. Extracts with an IC_{50} higher than 10 mg/mL were considered as non-active extracts.

2.4.2. β-carotene bleaching method

The antioxidant activity of extracts and controls was measured by the β-carotene bleaching microplate adapted method, modified in accordance with literature (Koleva *et al.* 2002). For this, 2 mL of a β-carotene solution in chloroform (0.1 mg/mL) were added to round-bottom flasks containing 20 mg of linoleic acid and 200 mg of Tween 40. After evaporation under pressure, oxygenated distilled water (50 mL) was added, and the mixture was shaken to form a liposome solution. This mixture was added to 12 µL of extracts, or positive controls (α-tocopherol, BHA and BHT), or negative controls (distilled water and ethanol). The absorbance of the solution at 450 nm was measured immediately (t = 0 min) and after 2 h at 50°C (t = 120 min). All samples were assayed in triplicate. Antioxidant activity was expressed through the antioxidant activity coefficient (AAC) as follows (equation 1):

$$AAC = \left[\frac{As_{(120)} - Ac_{(120)}}{Ac_{(0)} - Ac_{(120)}}\right] \times 1000\ (eq.)$$

where $As_{(120)}$ is the absorbance of the antioxidant mix at t = 120 min, $Ac_{(120)}$ is the absorbance of the control at t = 120 min, and $Ac_{(0)}$ is the absorbance of the control at t = 0 min. Since the positive controls, BHA and BHT, had an average AAC of 700, this value was arbitrarily chosen to express the antioxidant activity as AAC_{700} (Le Lann *et al.* 2008). AAC_{700} was then the concentration of substrate needed to obtain an AAC value of 700. A high AAC_{700} was considered as indicative of a weak antioxidant activity.

2.5. NMR analysis of extracts

The global structural composition of crude extracts was assessed by means of ^1H NMR analyses on a Bruker Avance 400 using standard pulse sequences available in the Bruker software (Bruker, Wissembourg, France). All spectra were recorded at room temperature in AcD or MeOD, depending of the used extraction solvent. Chemical shifts were expressed in ppm. NMR profiles unambiguously point out PC within extracts, with peak(s) between 5.5 and 6.5 ppm corresponding to signals visible in HR-MAS NMR (Tanniou *et al.* 2013a) and not hampered by very large mannitol signals (polyol visible between 3.6 and 3.9 ppm). Indeed, absence of mannitol will facilitate the phenolic compounds purification after extraction.

2.6. Statistics

All analyses were carried out in triplicate, and their results are presented as mean values ± standard deviation (SD), using the Statistica 8 (StatSoft ®) software for PC. Homogeneity of variance was tested with the Brown-Forsythe test at the 0.05 risk error. The data which did not satisfy the criteria of normality and homoscedasticity for parametric tests were square root

transformed. Afterwards, three ways ANOVA were performed on TPC, radical scavenging activity (IC_{50}, DPPH test) and antioxidant activity (AAC_{700}, β-carotene bleaching test), using temperature, duration and solvents as fixed factors. When ANOVA demonstrated significant difference, a post hoc Tukey HSD test was carried out to know which means contributed to the effect. Occasionally when it was useful for a better understanding, one-way ANOVA were performed on some extraction conditions. A principal components analysis (PCA) was used to illustrate extraction conditions discrimination. PCA test was performed with the ten solvent mixtures to highlight the solvent efficiency with 40°C as extraction temperature and 2 or 3 h as extraction duration. Variables used to perform the PCA were the TPC in algae or in the fraction, radical scavenging (DPPH) and antioxidant activity (β-carotene bleaching method).

Chemicals

All reagents used in the experiments were of analytical grade and obtained mostly from Sigma. Solvents used for extraction of algae samples were purchased from Fisher Scientific. Water used was of Millipore quality.

3. Results

3.1. Distinction between processes using PC contents

The different extraction combinations had a significant effect on the TPCs extracted from *Sargassum muticum* ($p<0.001$, Tables 1-2). Thus, in the tables, the highest TPCs were measured on TPC extracted during 3h, at 40°C, and using Acetone-Water as solvents (5.92 ± 0.15%DW); on the other hand, the lowest ones were determined on the 3h, 20°C, Ethyl Acetate extracts (0.38 ± 0.05%DW) (Table 2). Whatever the used solvent and the extraction duration, a temperature of 40°C is the most effective temperature permitting to reach TPC content superior to 3.37%DW (Table 2). For this temperature, the duration has a significant effect (One way ANOVA on 40°C data with duration as fixed factor and PC as dependent variable; Tukey HSD $p<0.05$): 1h is less effective than 2 or 3h for the quasi totality of the tested solvents (EtOH-Water 2h less effective than 1h one). No difference was observed between 2 and 3 hours of extraction. Acetone, Acetone-Water and MeOH-Water mixture are the most effective solvent mixture for TPC extraction. One should note that at 40°C with 2 or 3h extraction duration extract, TPC can reach more than 5%DW of *S. muticum* (5.06 ± 0.01%DW; 4.98 ± 0.14%DW; 5.15 ± 0.07%DW for the 2h, Acetone, Ac-Water and MeOH-Water mixtures, respectively and 5.92 ± 0.15%DW; 5.48 ± 0.21%DW for the 3h, Acetone-Water and MeOH-Water solvent mixture, respectively).

Besides having conditions allowing an extraction of the maximum of PC contained in the seaweed, it is interesting to obtain an extract composed in great majority of PC. Here the results are expressed in %DW where the dry weight is that of the obtained extract. The different extraction processes had a significant effect on the TPCs quantity in extracts ($p<0.001$, Figure 1, Table 1). Thus, the effect of temperature is clearly visible: 40°C is the most effective temperature whatever the extraction duration and the used solvent. Obtained extract can be enriched in PC at

more than 50%DW (Ac, 40°C, 2h). The minimum is obtained with a diluted Ethyl-acetate, 3h, 25°C combination (2.80 ± 0.04%DW). The extraction duration has a significant effect on TPC (One way ANOVA with duration as fixed factor and PC as dependent variable; Tukey HSD $p<0.05$): 1h is less effective than 2 or 3h for the quasi totality of the tested solvents (MeOH-Water 2h less effective than 1h one). Acetone, Acetone-Water, EtOH and EtOH-Water mixture seem to be the most effective solvent mixtures for obtaining a PC enriched fraction. At 40°C with 2 or 3h extraction duration TPC can reach more than 20%DW of the extract (51.96 ± 2.33%DW; 24.98 ± 0.57%DW for the 2h, Acetone and EtOH extracts, respectively and 46.84 ± 1.32%DW; 22.75 ± 0.59%DW; 29.06 ± 1.35%DW; 17.89 ± 2.53%DW for the 3h, Acetone, Acetone-Water, EtOH and EtOH-Water extracts, respectively).

Table 1 - Variation in TPC (%DW in the fraction or in the algae), IC_{50} (antiradical activity, DPPH test) and AAC_{700} (antioxidant activity, β-carotene bleaching test) in extracts from *Sargassum muticum* according to the extraction method.

Variable	Statistical test		Fixed factors						
			Temperature	Duration	Solvent	Temp*Dur	Temp*Solv	Dur*Solv	Temp*Dur*Solv
IC 50 (mg/mL)	Two Way Anova	df	2	2	8	4	16	16	32
		F	860.48	1105.76	6306.14	245.56	985.89	573.61	516.12
		p	0.12	0.06	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
	Tukey p<0.05		-	-	**Ac=Acd=Water=EtOH=ETOHd=MeOH=MeOHd**>EAd>EA				
AAC_{700} (mg/mL)	Two Way Anova	df	2	2	8	4	16	16	32
		F	1107.40	2.78	678.07	10.09	201.11	28.94	28.43
		p	$p < 0.001$	0.06	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
	Tukey p<0.05		**20**>60>40°C	-	**MeOH=EtOH**≥Acd=Ac=MeOHd=EtOHd≥Water≥EAd>EA				
TPC ($\%DW_{fraction}$)	Two Way Anova	df	2	2	8	4	16	16	32
		F	3597,92	212,09	1595,08	323,97	227,76	38,53	95,33
		p	$p < 0.001$	0.17	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
	Tukey p<0.05		**40**>20=60°C	-	**Ac**>EtOH>Acd=EtOHd=MeOH=MeOHd=EA=Ead=Water				
TPC ($\%DW_{algae}$)	Two Way Anova	df	2	2	8	4	16	16	32
		F	1404,63	420,21	595,90	391,95	70,13	45,35	44,89
		p	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
	Tukey p<0.05		**40**>20=60°C	**2=3**>1h	**Acd**>MeOHd=MeOH=Ac=EtOH≥EtOHd≥EAd≥Water≥EA				

Extraction solvents: Ac: Acetone, Acd: Acetone-Water 50:50 (v:v); EtOH: Ethanol, EtOHd: Ethanol-Water 50:50 (v:v); MeOH: Methanol, MeOHd: Methanol-Water 50:50 (v:v); EA: Ethyl acetate, EAd: Ethyl acetate-Water 50:50 (v:v)

Table 2 - Total phenolic content (TPC) in extracts from *Sargassum muticum* according to the different extraction methods (express in %Dry Weight with regard to the weight of algae pounder used for the extraction). The richest extracts for each temperature/duration combination were in bold characters.

Duration	Solvent	TPC (%DW_{algae}) Means ± SD								
		20°C			40°C			60°C		
1h	Ac	1.43	±	0.06	2.25	±	0.08	2.33	±	0.03
	Acd	**2.83**	**±**	**0.38**	0.54	±	0.01	**3.34**	**±**	**0.17**
	EtOH	1.97	±	0.02	2.69	±	0.16	2.02	±	0.06
	EtOHd	2.44	±	0.17	1.79	±	0.09	2.40	±	0.25
	MeOH	2.08	±	0.05	**3.06**	**±**	**0.29**	1.87	±	0.10
	MeOHd	2.24	±	0.02	1.45	±	0.17	2.35	±	0.15
	EA	0.70	±	0.07	1.45	±	0.52	0.62	±	0.08
	Ead	1.54	±	0.01	1.16	±	0.40	1.69	±	0.18
	Water	1.51	±	0.05	2.41	±	0.55	0.84	±	0.19
2h	Ac	2.14	±	0.03	**5.06**	**±**	**0.01**	1.59	±	0.02
	Acd	**2.73**	**±**	**0.03**	**4.98**	**±**	**0.14**	**3.07**	**±**	**0.04**
	EtOH	2.44	±	0.04	3.27	±	0.07	2.29	±	0.05
	EtOHd	2.49	±	0.27	1.54	±	0.06	2.23	±	0.02
	MeOH	2.60	±	0.15	4.48	±	0.05	2.06	±	0.05
	MeOHd	2.26	±	0.05	**5.15**	**±**	**0.07**	2.39	±	0.04
	EA	0.62	±	0.11	1.16	±	0.11	0.69	±	0.04
	Ead	1.56	±	0.32	3.28	±	0.38	1.54	±	0.01
	Water	1.33	±	0.04	2.55	±	0.03	0.75	±	0.01
3h	Ac	2.41	±	0.06	4.59	±	0.13	2.18	±	0.06
	Acd	**3.37**	**±**	**0.09**	**5.92**	**±**	**0.15**	**3.09**	**±**	**0.05**
	EtOH	1.89	±	0.14	4.34	±	0.20	2.62	±	0.05
	EtOHd	2.30	±	0.09	2.21	±	0.31	1.93	±	0.05
	MeOH	2.22	±	0.07	4.81	±	0.12	2.38	±	0.12
	MeOHd	1.96	±	0.02	5.48	±	0.21	2.53	±	0.09
	EA	0.38	±	0.05	1.65	±	0.22	0.64	±	0.01
	Ead	1.02	±	0.01	3.25	±	0.10	1.42	±	0.21
	Water	1.20	±	0.08	2.81	±	0.07	1.11	±	0.02

Extraction solvents: Ac: Acetone, Acd: Acetone-Water 50:50 (v:v); EtOH: Ethanol, EtOHd: Ethanol-Water 50:50 (v:v); MeOH: Methanol, MeOHd: Methanol-Water 50:50 (v:v); EA: Ethyl acetate, EAd: Ethyl acetate-Water 50:50 (v:v)

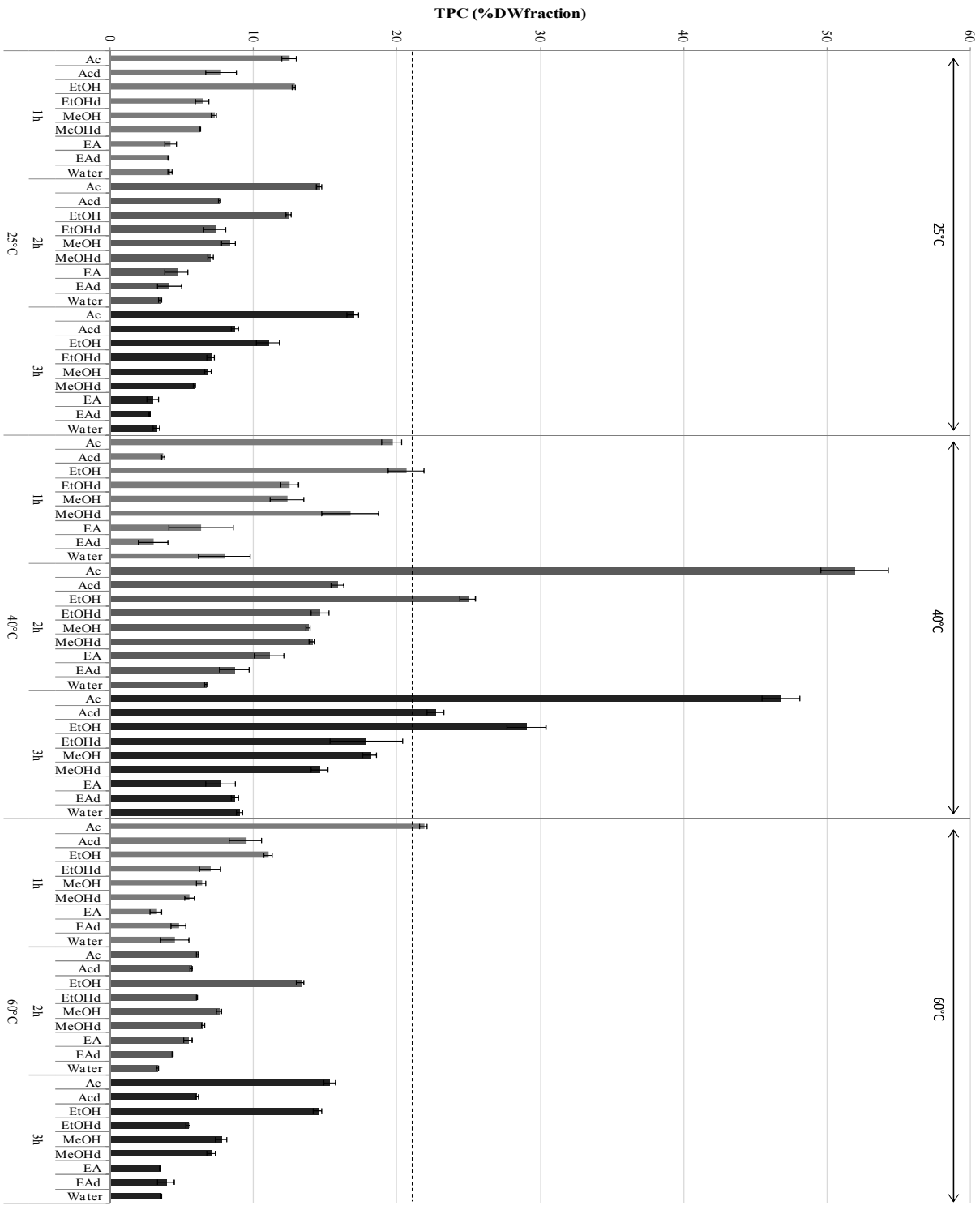


Figure 1 - Total phenolic content (TPC) extracted from *Sargassum muticum* according to the different extraction factors combination (solvent/temperature/duration) express in %Dry Weight with regard to the weight of the fraction obtained after extraction. Extraction solvents: Ac: Acetone, Acd: Acetone-Water 50:50 (v:v); EtOH: Ethanol, EtOHd: Ethanol-Water 50:50 (v:v); MeOH: Methanol, MeOHd: Methanol-Water 50:50 (v:v); EA: Ethyl acetate, EAd: Ethyl acetate-Water 50:50 (v:v).

3.2. NMR analysis of extracts

Figure 2 shows another way to measure extraction temperature and duration effects on the quantity of extracted CPs. NMR allows validating the results according to the Folin-Ciocalteu test. Thus, for Acetone 100 % as extraction solvent, a time and a duration effect on CPs extraction were visible: beyond 2 hours of extraction at 40°C no evolution of the quantity of CPs was showed (Fig.2-a, b and c), on the other hand 1 hour of extraction is not sufficient (Fig.2-a). For the temperature, at the end of 3 hours of extraction, 25°C does not allow to extract the maximum of CPs (Fig.2-d). The maximum is obtained with 2 hours of extraction (Fig.2-e). For the mixture acetone-water we can make the same report for the effect of the extraction temperature which was more effective at 40°C (Fig.2-k) on the other hand it would seem that 3 hours are necessary to obtain the maximum of CPs (Fig.2-i).

Finally, for MeOH, a small effect of the extraction duration was visible (Fig.2-m, n and o), also for the temperature effect where 40°C seems to be the most effective temperature (Fig.2-q). We can also notice that pure acetone allows extracting very few sugars, i.e. mannitol, compared with the two others solvents which can be a great advantage for a future purification. In addition, NMR CP profiles are very different between the different used solvents.

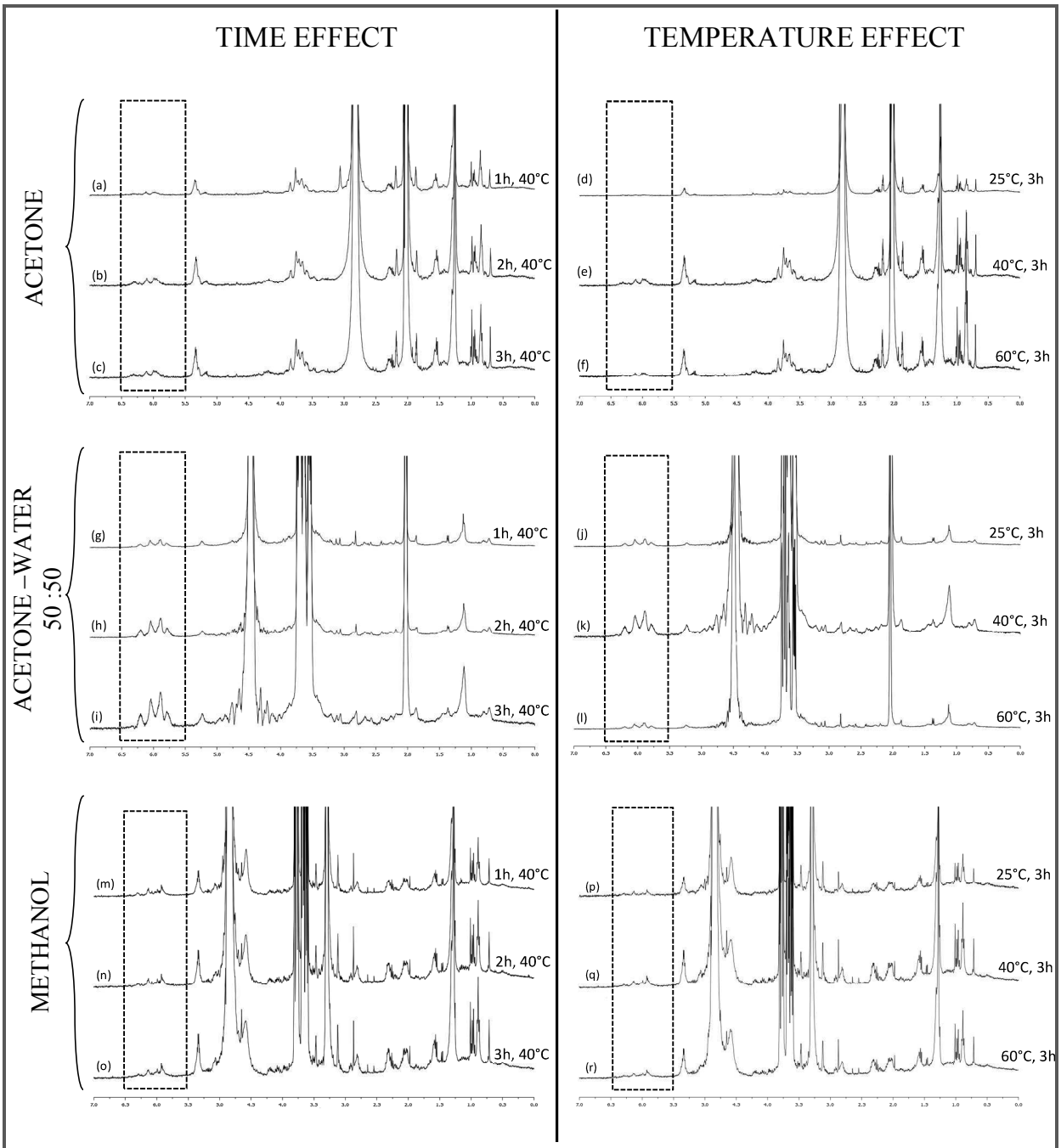


Figure 2 - ^{1}H RMN extracts profiles in the 0 to 7 ppm area. The phenolic area between 5.5 and 6.5 ppm is surrounded. Effect of extraction duration (1, 2 or 3 hours with the temperature fixed at 40°C) and temperature (20, 40 or 60°C with the extraction duration fixed at), respectively, on acetone extracts in AcD [a-f] on acetone-water extracts in AcD [g-l] and finally on Methanol extracts in MeOD [m-r].

3.3. Monitoring of activities in extracts between various processes

The different extraction combinations had a significant effect on the antioxidant activity of algal extracts ($p<0.001$, Table 1). The antioxidant activity determined by the β-carotene bleaching method (ACC_{700}) was the highest in extracts made at a temperature of 20°C ($p<0.001$, Table 1). According to the ANOVA post hoc Tukey test ($p<0.05$), MeOH, ETOH, Acetone pure or diluted extracts allowed activities equivalent to positive controls BHT and Vitamin E with some Temperature/duration combinations. The antioxidant activity determined by the β-carotene bleaching method (ACC_{700}) was the highest in EtOH and Ac50 extracts (0.66 ± 0.03; 0.67 ± 0.16 and 0.69 ± 0.04 mg.mL $^{-1}$ for EtOH 1h/20°C; Ac50 1h/40°C and EtOH 2h/20°C respectively) (Table 3). The extraction duration has no effect on the antioxidant activity of extracts ($p=0.06$, Table 1). At 40°C only Ac50, Ac and MeOH allowed activities equivalent to positive controls BHT and Vitamin E (for example: 0.67 ± 0.16; 0.93 ± 0.02 and 1.16 ± 0.04 mg.mL $^{-1}$, respectively). At 60°C only Ac, EtOH, EtOHd and MeOH allowed activities equivalent to positive controls BHT and Vitamin E (for example: 0.90 ± 0.15; 0.74 ± 0.03; 1.07 ± 0.03 and 0.94 ± 0.01 mg.mL $^{-1}$, respectively). In all cases, extracts obtained with pure or diluted ethyl acetate and water as extraction solvents does not show antioxidant activities.

The different extraction combinations had a significant effect on the radical scavenger activity of algal extracts ($p<0.001$, Table 1). According to the ANOVA, no temperature or duration effect was observed on the IC_{50} (Table 1). According to the ANOVA post hoc Tukey test, MeOH, ETOH, Acetone pure or diluted extracts allowed activities equivalent to positive controls BHT and Vitamin E with some temperature/duration combinations (Table 4). The radical scavenger activity determined by DPPH method (IC_{50}) was the highest in Acetone extracts (0.29 ± 0.01 mg.mL $^{-1}$ for 2 and 3h/40°C) (Table 4). These two extracts possess also a superior or equal activity as the positive controls (Table 4). As for the antioxidant activity, extracts obtained with pure or diluted ethyl acetate and water as extraction solvents does not show radical scavenger activities. Otherwise, nearly linear relations between the IC_{50} and the TPC in the obtained fractions were observed ($R^2 = 0.82$, data not shown) taking into account samples obtained at 40°C with 2 or 3 hours as extraction duration and for which IC_{50} can be compared with positive controls.

Table 3 - Mean values of AAC_{700} (antioxidant activity, β-carotene bleaching test) measured on extracts from *Sargassum muticum* according to the extraction method (SD: Standard Deviation). The most active extracts for each temperature/duration combination were in bold characters.

Duration	Solvent	AAC_{700} (mg/mL) Means ± SD (Tukey HSD (p<0.05))											
		20°C				40°C				60°C			
1h	Ac	1.48	±	0.34	-	1.26	±	0.01	-	0.90	±	0.15	(a,b)
	Acd	1.04	±	0.07	(a,b)	**0.67**	**±**	**0.16**	(a,b)	1.25	±	0.08	-
	EtOH	**0.66**	**±**	**0.03**	(a,b)	2.10	±	0.24	-	**0.86**	**±**	**0.03**	(a,b)
	EtOHd	1.06	±	0.03	(a,b)	1.97	±	0.26	-	1.07	±	0.03	(a,b)
	MeOH	0.87	±	0.03	(a,b)	1.16	±	0.04	(a,b)	0.94	±	0.01	(a,b)
	MeOHd	0.98	±	0.01	(a,b)	3.85	±	0.36	-	1.37	±	0.01	-
	EA	2.34	±	0.12	-	5.58	±	0.13	-	8.17	±	0.59	-
	Ead	1.56	±	0.15	-	7.36	±	0.22	-	1.41	±	0.07	-
	Water	1.35	±	0.06	-	2.56	±	0.06	-	1.33	±	0.03	-
2h	Ac	0.83	±	0.15	(a,b)	1.93	±	0.34	-	3.59	±	0.40	-
	Acd	1.30	±	0.08	-	**1.40**	**±**	**0.11**	-	2.06	±	0.32	-
	EtOH	**0.69**	**±**	**0.04**	(a,b)	1.71	±	0.10	-	**0.78**	**±**	**0.10**	(a,b)
	EtOHd	0.91	±	0.06	(a,b)	3.20	±	0.25	-	1.26	±	0.05	-
	MeOH	0.89	±	0.11	(a,b)	**1.38**	**±**	**0.21**	-	1.03	±	0.03	(a,b)
	MeOHd	0.90	±	0.01	(a,b)	1.71	±	0.23	-	1.51	±	0.04	-
	EA	1.37	±	0.19	-	5.56	±	0.86	-	5.62	±	0.43	-
	Ead	1.84	±	0.27	-	4.25	±	0.13	-	2.11	±	0.50	-
	Water	1.40	±	0,00	-	4.86	±	0.30	-	1.82	±	0.32	-
3h	Ac	0.85	±	0.06	(a,b)	**0.93**	**±**	**0.02**	(a,b)	2.26	±	0.63	-
	Acd	1.22	±	0.11	(b)	1.13	±	0.09	(a,b)	1.86	±	0.20	-
	EtOH	**0.74**	**±**	**0.05**	(a,b)	1.65	±	0.38	-	**0.74**	**±**	**0.03**	(a,b)
	EtOHd	0.96	±	0.04	(a,b)	4.10	±	0,00	-	1.32	±	0.08	-
	MeOH	0.97	±	0.03	(a,b)	1.19	±	0.15	(a,b)	1.04	±	0.01	(a,b)
	MeOHd	1.04	±	0.01	(a,b)	1.59	±	0.27	-	1.35	±	0.03	-
	EA	1.91	±	0.48	-	6.78	±	0.33	-	5.41	±	0.50	-
	Ead	1.59	±	0.11	-	7.88	±	0.39	-	1.98	±	0.43	-
	Water	1.80	±	0.07	-	3.39	±	0.35	-	1.86	±	0.11	-
Positive controls		**BHT:**	0.40	±	0.04	(a,b)		**Vit E:**	0.37	±	0.01	(a)	

Extraction solvents: Ac: Acetone, Acd: Acetone-Water 50:50 (v:v); EtOH: Ethanol, EtOHd: Ethanol-Water 50:50 (v:v); MeOH: Methanol, MeOHd: Methanol-Water 50:50 (v:v); EA: Ethyl acetate, EAd: Ethyl acetate-Water 50:50 (v:v)

Table 4 - Mean values of IC_{50} (radical scavenging activity, DPPH test) measured on extracts from *Sargassum muticum* according to the extraction method (SD: Standard Deviation). The most active extracts for each temperature/duration combination were in bold.

Duration	Solvent	IC50 (mg/mL)Means ± SD (Tukey HSD (p<0.05))											
		20°C				40°C				60°C			
1h	Ac	**0.69**	±	**0.04**	(a,b,c)	0.66	±	0.01	(a,b,c)	**0.36**	±	**0.02**	(a,b)
	Acd	1.23	±	0.05	-	**0.50**	±	**0.11**	(a,b,c)	1.10	±	0.04	-
	EtOH	**0.68**	±	**0.11**	(a,b,c)	**0.55**	±	**0.01**	(a,b,c)	0.72	±	0.01	(a,b,c)
	EtOHd	1.50	±	0.03	-	1.15	±	0.03	-	1.30	±	0.05	-
	MeOH	1.09	±	0.03	-	1.18	±	0.04	-	1.20	±	0.05	-
	MeOHd	1.40	±	0.06	-	1.57	±	0.13	-	1.54	±	0.04	-
	EA	*non active*			-	*non active*			-	*non active*			-
	Ead	4.19	±	0.23	-	*non active*			-	1.93	±	0.13	-
	Water	2.32	±	0.10	-	1.38	±	0.11	-	3.21	±	0.03	-
2h	Ac	**0.50**	±	**0.01**	(a,b,c)	**0.29**	±	**0.01**	**(a)**	1.24	±	0.08	-
	Acd	1.23	±	0.11	-	0.91	±	0.04	(a,b,c)	1.58	±	0.01	-
	EtOH	**0.46**	±	**0.17**	(a,b,c)	0.54	±	0.10	(a,b,c)	**0.58**	±	**0.01**	(a,b,c)
	EtOHd	1.26	±	0.02	-	1.38	±	0.19	-	1.42	±	0.03	-
	MeOH	0.95	±	0.01	(a,b,c)	1.14	±	0.08	-	1.08	±	0.03	-
	MeOHd	1.24	±	0.10	-	1.16	±	0.02	-	1.38	±	0.05	-
	EA	*non active*			-	*non active*			-	2.67	±	0.43	-
	Ead	3.06	±	0.40	-	2.87	±	0.21	-	2.06	±	0.04	-
	Water	2.80	±	0.04	-	3.64	±	0.41	-	3.01	±	0.15	-
3h	Ac	**0.48**	±	**0.09**	(a,b,c)	**0.29**	±	**0.01**	**(a)**	**0.49**	±	**0.01**	-
	Acd	1.07	±	0.23	(a,b,c)	0.72	±	0.01	(a,b,c)	1.41	±	0.07	-
	EtOH	0.64	±	0.01	(a,b,c)	0.49	±	0.01	(a,b,c)	0.56	±	0.02	-
	EtOHd	1.15	±	0.03	-	1.50	±	0.04	-	1.62	±	0.05	-
	MeOH	1.11	±	0.03	-	0.88	±	0.02	(a,b,c)	1.04	±	0.01	(a,b,c)
	MeOHd	1.42	±	0.11	-	1.24	±	0.05	-	1.25	±	0.02	-
	EA	*non active*			-	*non active*			-	4.69	±	0.71	-
	Ead	3.09	±	0.14	-	2.98	±	0.08	-	2.26	±	0.04	-
	Water	2.62	±	0.08	-	2.65	±	0.06	-	2.41	±	0.39	-

Positive controls	**BHT:**	0.37	±	0.09	(a,b)	**Vit E:**	0.41	±	0.10	(a,b,c)

Ac: Acetone, Acd: Acetone-Water 50:50 (v:v); EtOH: Ethanol, EtOHd: Ethanol-Water 50:50 (v:v); MeOH: Methanol, MeOHd: Methanol-Water 50:50 (v:v); EA: Ethyl acetate, EAd: Ethyl acetate-Water 50:50 (v:v)

***non active*: IC_{50}< 10 mg/mL**

3.4. Extraction conditions discrimination by PCA

Figure 3 shows a biplot of the normalized scores in the Factor1-Factor 3 areas. The sample projection on all the factor axes allowed us to choose Factors 1 and 3, which represented 89.39% of the total variance. The clustering technique is based on the sample similarity expressed according to TPC in the alga and in the extract, antioxidant (β-carotene bleaching method) and radical scavenger activities (DPPH assay) of the extracts. All the combinations being of the right-hand side of the graph will not be taken into account, considering the fact that they allow opposite evolutions in regard to the studied factors. Thus, solvents such as EA, water and diluted ethanol will be to avoid for the extraction of active PCs from *S. muticum*. If we are interested in combinations allowing a maximum of antioxidant activity we shall consider the group #3. Group #2 shows us combinations allowing at the same time a good PCs extraction while protecting both antioxidant and radical-scavenger activities. Finally, in case we would look rather for a combination allowing to preserve all the PC composing the initial pool of compounds with a good radical scavenger activity, we shall be interested, as in this study case, in group #1. Thus, pure acetone or ethanol seems to be the most effective solvent when taking into account all parameters. The CPA analysis shows clearly the opposed tendency between antioxidant (β-carotene bleaching method) and radical scavenger (DPPH assay) activities.

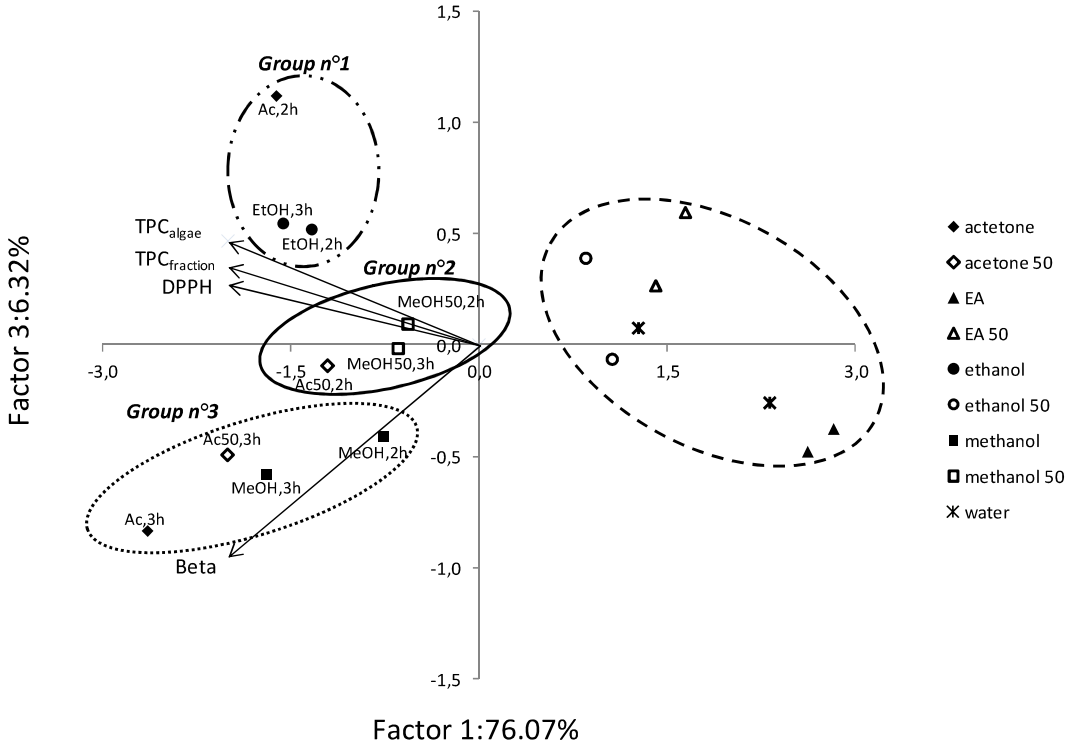


Figure 3 - Principal component analysis (PCA): projection of 80 extractions combinations on the Factor 1 vs. Factor 2 planes. Ac:Acetone; Acd: acetone:Water 50:50 (v/v); EtOH:ethanol; EtOHd: ethanol:Water 50:50 (v/v); MeOH:methanol; MeOHd:methanol:water 50:50 (v/v); EA: ethyl:acetate; EAd:ethyl acetate 50:50 (v/v).

4. Discussion

This study allowed demonstrating the necessity of a preliminary study on the best Solvent-Temperature-Duration (STD) extraction combination for a given alga before to carry out deeper analyses. Indeed we see here that all the parameters interact on the content and the activity of the extracted phenolic compounds. First, it is important to find a protocol allowing the obtaining of a PC rich fraction while making sure that it has allowed extracting the majority of the PC initially present in the studied alga.

In this study, the most efficient solvents for extracting the majority of algal PC (TPC therefore expressed in % Dry Weight of the freeze-dried alga) together with an interesting activity in *S. muticum*, are Acetone, Ethanol and Methanol (all these solvents used pure or diluted) which permitted the obtaining of PC quantity superior to 4% DW. Different TPC were obtained on the same species by other authors who found values between 0.2 and 6%DW (Connan *et al.* 2006; Le Lann *et al.* 2012). In this study, only diluted acetone allowed reaching 6 %DW. TPC depends on the environment parameters and/or of the seaweed thallus part kept for extraction (Fairhead *et al.* 2005; Connan *et al.* 2006). Here, to have a homogeneous algal material, the totality of the thallus (without holdfast) was kept for extraction. In the same way thalli of *S. muticum* were collected in summer when they usually produce the maximum of PC (Plouguerné *et al.* 2006; Le Lann *et al.* 2012). However this quantity varies between sites (depending on environmental conditions). All these considerations could explain why TPC were different between these experimental studies described in the literature. For the same species, following sites, seasons and thallus portion, PC contents vary, together with the polarity of compounds extracted. However, a solvent allowing to extract a maximum of algal PC will not necessarily allow to obtain a fraction composed of more than 20 % PC; it was the case of the Acetone-Water mixture for example. Indeed, aqueous mixtures allow the extraction of other numerous compounds in great quantities such as some polysaccharides (for example mannitol). These other polluting compounds can hamper for the future PC purification. Thus, a solvent such as Acetone seems to be the most appropriate. Indeed, it allows enriching the extract with more than 50 % PC where the other solvents allow to recovering only 30 % DW maximum (case of the Ethanol for example). Acetone-water mixture is moreover used for the Brazilian *Sargassum vulgare* by other authors (Plouguerné *et al.* 2012).

Extraction temperature also plays a role in the extraction quality. Some authors however prefer carrying out their extractions at room temperature to avoid compounds degradation (Chandini *et al.* 2008; Lopez *et al.* 2011). The effect of the temperature was tested with the aim of seeing if it was possible to decrease energy cost of extracts heating. It emerges from the results that the increase of the temperature is crucial for a good PC extraction. Among the tested temperatures, the ideal temperature for the PC extraction was 40°C. Below this temperature extraction is possible but the extraction yield largely decreased above. Conversely, an increase of the temperature up to 60°C seems to have a fatal effect on the extraction as it was shown on the NMR spectra (risk of denaturation of PC, extraction of others compounds, …). This effect being dependent on the extraction duration: longer is the extraction; more the temperature will have a

fatal effect. Actually no paper refers to the negative effect of an increase of temperature during the extraction process. Even if it was reported by many authors that PC are sensitive to high temperatures, other authors showed the opposite and demonstrated the positive effect of the increase of temperature under limit on the extraction yield (Pompeu *et al.* 2009; Rodríguez-Meizoso *et al.* 2010; Tanniou *et al.* 2013a). However the extraction duration is clearly shorter than those tested in this study. Thus, this parameter has a crucial role, and also depends on the chosen extraction temperature (cf statistical results, Table 1). Results indicated that in the tested extreme temperatures, 20 and 60°C, the extraction duration has a small influence. On the other hand, at 40°C we noticed a clear improvement of the extracted PC quantity and quality after 2-3 hours. Statistically, no difference was underlined between 2 and 3 hours of extraction. However, it is important to notice that TPC measured by Folin–Ciocalteu assay do not give an exact representation of the quality of the phenolic compounds in the extracts. Several methods have been developed to identify polyphenols from plants, fruits and vegetables using RP-HPLC analysis or NMR. Here, tendencies revealed by the obtained NMR spectra and by the colorimetric Folin-ciocalteu test are identical. The NMR allows to having a comparative and qualitative approach in term of chemical composition at a given time. In addition it could give additional information on the selectivity of each solvent for a selected group of polyphenols like it was noticed for flavonoides by Marston and Hostettmann (2006). Thus, in our study, NMR spectra show that extracted phlorotannins are not in the same proportions following the used solvent. Finally, the pure Acetone NMR spectrum showed none or negligible amounts of mannitol, a major interfering polar component. Indeed, the absence of mannitol in the crude extract will facilitate furthermore the phenolic compounds purification.

Concerning active compounds, one should retain that the choice of the extraction conditions is important for preserving PC activity. In our study, the Ethanol, Methanol and Acetone pure or diluted produced the most active extracts, depending on the extraction conditions. As already mentioned, high temperature used by some processes can have a detrimental effect on the PC. In fact, for the quasi totality of mixtures, there was a decrease in activity at 60°C except when the extraction duration was only 1 hour, suggesting that the temperature might play a negative role on the extracted compounds activity when exposure time was too long. Indeed, in other studies, an activity decrease with an increase of temperature has been reported (Plaza *et al.* 2010), but this was not confirmed as an overall trend for every solvent (Pompeu *et al.* 2009; Rodríguez-Meizoso *et al.* 2010). Acetone extracts had very interesting radical-scavenging activities similar to those obtained with positive controls (IC 50: 0.29 ± 0.01 and 0.29± 0.01 mg.mL $^{-1}$ for the 40°C-2h and 40°C-3h extraction conditions, respectively) and higher than those obtained for the same species with other extraction solvents (Le Lann *et al.* 2008). Ethanol extracts had also good DPPH activities (IC 50: 0.54 ± 0.10 and 0.49 ± 0.01 mg.mL $^{-1}$, for the 40°C-2h and 40°C-3h extraction conditions, respectively). As already shown in the literature, active extracts shown by the DPPH test were not necessarily identical to those identified by the β-carotene test (Le Lann *et al.* 2008). Indeed, β-carotene test targets lipophilic compounds activity while the DPPH is less selective (Koleva *et al.* 2002). In our study, the most active extracts shown by the DPPH were rarely shown by β-carotene, suggesting a non-lipophilic

nature of the active compounds. Except for the case of extracts obtained at 25°C, very few extracts have antioxidant activities (visible by a low AAC_{700}) comparable to the positive controls. We also noticed that active extracts with DPPH are also the ones containing most PC with regard to the Folin-Ciocalteu assay, as previously reported by other authors (Connan *et al.* 2006; Zubia *et al.* 2009). For extracts with a radical scavenger activity equivalent to positive controls, a direct correlation between CP and antioxidant activity was highlighted, even if several authors denied this and attributed activities to other secondary metabolites produced by the seaweed (Deal *et al.* 2003). The Folin-Ciocalteu component of the test used to quantify PC does not only measure total phenol content, but also reacts with any reducing substances. This reagent therefore measures the reducing capacity of the totality of the sample, and not only the level of phenolic compounds (Huang *et al.* 2005). Thus it is not surprising to find a correlation between the DPPH results and those obtained by the Folin-Ciocalteu assay. In our case this procedure remained interesting to permit a comparison between our results and those obtained in the literature.

The PCA allowed an overview of the most interesting results of our study, in combining information on the three tested parameters. As noticed previously, the most effective temperature for the extraction is 40°C, while preserving the activity of PC. In this case, 2 or 3 hours of extractions are necessary. As our main objective was to characterize the pool of PC, it should be focused on a process allowing phenolics extraction in large quantities, e.g. Acetone-Water mixture, with 2h as extraction duration and 40°C as extraction temperature. Also, for a future purification it could be necessary to favor a solvent, such as Acetone, allowing to obtain active fractions containing more than 50 % PC in 2 hours. On the other hand, for a commercial use of the extracts, i.e. a tradeoff between activity and market regulations for food products is sought, a process using Ethanol that better complies with European norm is more appropriate: respect of REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances) norm and of IPPC (Integrated Pollution Prevention Control) directive. In this respect, Ethanol as extraction solvent allowed obtaining active PC fractions may be a sound candidate for industrial applications, being both more tractable for scaling-up and certainly more green: not toxic for the cosmetic or food industries and the environmental protection. But even if the invasive *S. muticum* represent a renewable biomass, this natural resource could cause supply problems for industries due to its seasonal availability (see below, Plouguerné *et al.* 2006; Tanniou, Unpublished results).

Besides, one should not forget that the chosen combinations would not have been the same for another species. Indeed, defining a standardized solid-liquid extraction protocol is somewhat illusory, as each species to be used would require at least some preliminary assays. For example, for two other brown algal species: *Ascophyllum nodosum* (Fucales) and *Pylaiella littoralis* (Ectocarpales), the most effective solvent was totally different (Tanniou, Personnal communication). So, before to transpose it to other species one should test the balance between solvent, temperature and duration of the procedure, as all brown macroalgal species produce different phenolic compounds. In the same way, the nature of the algal material used for the extraction as well as its physical state also act on the extraction quality. So it will be necessary to

pay attention on the particles size (crushing, sieving,..) acting on the availability of the solute and on the biomass conditioning before use (freeze-drying, air drying,..) (Le lann *et al.* 2008; Tanniou, Unpublished results); these conditioning procedures also acting on the quantity and the quality of extracting compounds.

Until now, solid-Liquid extraction is a time-consuming technique using sometimes toxic organic solvents in large quantities. Advanced alternative processes exist and are already used for the extraction of various biomolecules from seaweeds (Plaza *et al.* 2010). In particular, supercritical-fluid extraction (SFE), pressurized-liquid extraction (PLE) and Centrifugal Partition Extraction (PCE) can be used for these classes of compounds (Onofrejová *et al.* 2010; Plaza *et al.* 2010; Hamzaoui *et al.* 2011; Taamalli *et al.* 2012) but also for phlorotannins (Tanniou *et al.* 2013). For example, all kind of solvents can be used with PLE at relatively high temperatures and pressures in order to keep them in liquid state. The main advantages of this technology are the low solvent volumes needed and the short extraction times, compared to conventional processes. Moreover, high extraction yields have been commonly associated to this technique. In regard to our results, this technique with Ethanol as extraction solvent could be a promising alternative. However, maintenance considerations are to be considered for sustainable operability despite the excellent productivities reached by alternative processes. It must be considered that these processes have very long cleaning operations, and are very expensive (energy costs, investment). In these conditions, an improvement of Solid-Liquid extraction with agrosolvents, that still remains an inexpensive and easy to implement technique at the industrial scale, could be the most realistic solution.

Conclusion

Our study demonstrated the crucial influence of the main parameters occurring in extraction of interesting molecules. The three studied parameters were solvent, extraction duration and temperature, which interact with each other. Thus, by taking into account each effect, we can discriminate effective combinations depending of the intended utilization using the brown macroalga *S. muticum* collected in Brittany (France) as model. If an extraction of all the PC pool is needed, Acetone -Water mixture 50:50 (v/v) during 3h at 40°C allowed the better PC extraction: up to 5.92 ± 0.15 $\%DW_{algae}$. For a future purification, acetone afforded the most important yields in concentrated PC (51.96 ± 2.33 $\%DW_{fraction}$) also displaying the better radical scavenger activities (0.29 ± 0.01 $mg.mL^{-1}$ for IC_{50}). Finally, for a future valorization as ingredient in cosmetics or food industry, Ethanol solid-liquid extraction at 40°C during 2 hours seemed to be the most promising for the extraction of polyphenols that are endowed with useful antioxidant potential. It allowed a good PC extraction despite a lesser antioxidant activity of the extracts. Moreover a green solvent complies with the European requirements (REACH, IPPC). In fact, it could be an interesting alternative for the valorization of PC from *S. muticum* in Brittany. Nevertheless, this procedure is specific to *S. muticum* and before to transpose it to other species one should test the balance between solvent, temperature and duration of the procedure, as all brown macroalgal species produce different phenolic compounds.

Acknowledgments

This study is part of the Ph.D. thesis work carried out by the first author within the Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR UMR 6539) set at the IUEM (UBO-UEB). It was supported by the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de Recherche (UBO allocation). Authors would like to thank M.A. Poullaouec, I. Bihannic, students and staff of the Research Group for their help. This project is related to Phlorotann-ING (GIS Europôle Mer, 2010-2012) program.

References

Audibert L, Fauchon M, Blanc N et al (2010) Phenolic compounds in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: distribution and radical-scavenging activities. Phytochemical analysis : PCA 21:399–405

Bourgougnon N, Stiger-Pouvreau V (2011) Chapter 4: Chemodiversity and bioactivity within red and brown macroalgae along the French coasts, metropole and overseas departements and territories In: Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology (ed S-K Kim), pp 58-105

Chandini SK, Ganesan P, Bhaskar N (2008) In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. Food Chemistry 107:707–713

Connan S, Delisle F, Deslandes E, Ar Gall E (2006) Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. Botanica Marina 49:39–46

Deal MS, Hay ME, Wilson D, Fenical W (2003) Galactolipids rather than phlorotannins as herbivore deterrents in the brown seaweed *Fucus vesiculosus*. Oecologia 136:107–114

Fairhead VA, Amsler CD, McClintock JB, Baker BJ (2005) Variation in phlorotannin content within two species of brown macroalgae (*Desmarestia anceps* and *D menziesii*) from the Western Antarctic Peninsula. Polar Biol 28: 680-686

Fan D, Hodges DM, Zhang J, et al (2011) Commercial extract of the brown seaweed Ascophyllum nodosum enhances phenolic antioxidant content of spinach (*Spinacia oleracea* L) which protects Caenorhabditis elegans against oxidative and thermal stress. Food Chemistry 124:195–202

Hamzaoui M, Hubert J, Hadj-Salem J, Richard B, Harakat D, Marchal L, Lavaud C, Renault JH (2011) Intensified extraction of ionized natural products by ion pair centrifugal partition extraction. JChromatogr A 1218: 5254–5262

Hayouni EA, Abedrabba M, Bouix M & Hamdi M (2007) The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L and *Juniperus phoenicea* L fruit extracts. Food Chemistry 105: 267–273

Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of agricultural and food chemistry 53:1841–56

Keyrouz R, Abasq ML, Le Bourvellec C et al (2011) Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany. Food Chemistry 126:831–836

Koivikko R, Loponen J, Honkanen T, Jormalainen V (2005) Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. J Chem Ecol 31: 195-212

Koleva II, Van Beek TA, Linssen JPH (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochem Anal13: 8-17

Kuda T, Kunii T, Goto H (2007) Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Ecklonia stolonifera* and *Ecklonia kurome* products harvested and processed in the Noto peninsula, Japan. Food Chem 103: 900-5

Kukula-Koch W, Aligiannis N, Halabalaki M et al (2013) Influence of extraction procedures on phenolic content and antioxidant activity of Cretan barberry herb. Food chemistry 138:406–13

Kumar Chandini S, Ganesan P, Bhaskar N (2008) *In vitro* antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. Food Chem 107: 707-13

Le Lann K, Jégou C, Stiger-Pouvreau V (2008) Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: Comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R Ross. Phycol Res 56: 238-245

Le Lann K, Connan S, Stiger-Pouvreau V (2012) Phenology, TPC and size-fractioning phenolics variability in temperate Sargassaceae (Phaeophyceae, Fucales) from Western Brittany: native versus introduced species. Marine environmental research 80:1–11

López A, Rico M, Rivero A, Suárez de Tangil M (2011) The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. Food Chemistry 125:1104–1109

Marston A, Hostettmann K (2006) Separation and quantification of flavonoids In: Andersen, ØM, Markham, KR (Eds), Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications Boca Raton: CRC Press, New York, pp 1–36

Nagayama K (2002) Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 50:889–893

Nakai M, Kagayama N, Nakahara K, Miki W (2006) Phlorotannins as radical scavengers from the extract of *Sargassum ringgoldianum.* Mar Biotechnol 8: 409-14

Onofrejová L, Vasícková J, Klejdus B, Stratil P, Misurcová L, Krácmar S, Kopeck J, Vacek J (2010) Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 51: 464–470

Pinelo M, Rubilar M, Sineiro J & Nunez MJ (2004) Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). Food Chemistry 85: 267–273

Plaza M, Santoyo S, Jaime L, García-Blairsy Reina G, Herrero M, Senoráns FJ, Ibánez E (2010) Screening for bioactive compounds from algae. J Pharmaceutical and Biomedical Analysis 51: 450–455

Plouguerné E, Cesconetto C, Cruz CP et al (2012) Within-thallus variation in polyphenolic content and antifouling activity in *Sargassum vulgare.* Journal of Applied Phycology 24:1629–1635

Plouguerné E, Le Lann K, Connan S, Jechoux G, Deslandes E, Stiger-Pouvreau V (2006) Spatial and seasonal variation in density, reproductive status, length and phenolic content of the invasive brown macroalga *Sargassum muticum* (Tendo) Fensholt along the coast of Western Brittany (France). Aquat Bot 85: 337-4

Pompeu DR, Silva EM, Rogez H (2009) Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. Bioresource technology 100:6076–82

Rodríguez-Meizoso I, Jaime L, Santoyo S, Señoráns FJ, Cifuentes A, Ibáñez E (2010) Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 51: 456–63

Sanoner P, Guyot S, Marnet N (1999) Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp). J Agric Food Chem 47: 4847-53

Taamalli A, Arráez-Román D , Barrajón-Catalán E, Ruiz-Torres V, Pérez-Sánchez A, Herrero M, Ibañez E, Micol V, Zarrouk M, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2012) Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. Food and Chemical Toxicology 50: 1817–1825

Tanniou A, SerranoLeon E, Vandanjon L, Ibanez E, Mendiola JA, Cerantola S, Kervarec N, LaBarre S, Marchal L, Stiger-Pouvreau V (2013) Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model Talanta 104: 44-52

Targett NM, Arnold TM (2001) Effects of secondary metabolites on digestion in marine herbivores In: McClintock JB, Baker BJ (eds) Marine chemical ecology CRC, Boca Raton, pp 391-411

Toth GB, Pavia H (2001) Removal of dissolved brown algal phlorotannins using insoluble polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). J Chem Ecol 27: 1899-910

Wang,T, Jónsdóttir R, Ólafsdóttir G (2009) Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. Food Chemistry 116:240–248

Zubia M, Fabre MS, Kerjean V et al (2009) Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. Food Chemistry 116:693–701

II.2.4. Discussion

II.2.4.1.Effet de la nature du solide

a) Effet du conditionnement sur la qualité de l'extraction de CP

Cette étude montre un effet significatif du conditionnement sur la qualité et la quantité de composés phénoliques extraits à partir des différentes algues brunes étudiées (*Sargassum muticum*, *Ascophyllum nodosum* et *Pylaeilla littoralis*). Une étude similaire, effectuée par Le Lann *et al.* (2008a) a montré les mêmes tendances pour *S. muticum*, avec une différence au niveau des teneurs en composés phénoliques, globalement quatre fois plus élevées par rapport à notre présente étude ; ceci étant dû en grande partie à la période d'échantillonnage. Cependant les tendances étant les mêmes, on peut en déduire que la sensibilité aux différents conditionnements ne serait pas modifiée par le stade physiologique de l'algue. Notre étude met en évidence une variabilité interspécifique intéressante. Pour *S. muticum* et *P. littoralis,* la quantité de composés est réduite significativement par les différents types de séchages (à l'air, à l'étuve ou sur gel de silice). Les mêmes tendances ont été observées pour certaines plantes supérieures et d'autres espèces de macroalgues (Jiménez- Escrig *et al.*, 2001 ; Wong et Cheung, 2001 ; Toor et Savage, 2006 ; Lim et Murtijaya, 2007). Dès 1986, Ragan et Glombitza montraient que les composés phénoliques peuvent se dégrader rapidement lorsque les échantillons sont séchés à des températures dépassant les 40°C. Cependant, les résultats obtenus à partir d'*A. nodosum* ne montrent pas de dégradation des composés phénoliques. D'autres auteurs ont montré que le séchage à des températures avoisinant 60°C n'affectait pas les polyphénols contenus dans leurs échantillons (Larrauri *et al.*, 1997).

Certains auteurs mettent en avant trois mécanismes pouvant expliquer la diminution du contenu phénolique dans les échantillons séchés à haute température (Maillard et Berset, 1995 ; Le Lann *et al.,* 2008a):

1) une libération de certains composés liés aux parois cellulaires (Schoenwaelder et Clayton, 1998a,b) dûe à la rupture des liaisons avec certains polysaccharides ou protéines par exemple ;

2) une dégradation partielle des polymères composant les parois cellulaires due à des changements de conformation des noyaux aromatiques des composés phénoliques ou à l'oxydation.

et/ou 3) une dégradation thermique des phlorotannins par des enzymes oxydantes comme les polyphénoloxydases et les péroxydases. Tenant compte des conclusions faites par Le Lann *et al.* 2008a, toutes les manipulations se sont déroulées à l'abri de la lumière afin d'éviter tout biais supplémentaire, dû à la dégradation des CP à la lumière directe (Ragan et Glombitza, 1986 ; Mueller-Harvey, 2001; Lim et Murtijaya, 2007). Cette étude montre que seules les algues congelées permettent pour les trois espèces considérées de préserver la qualité et la quantité des

composés phénoliques présents initialement dans les algues fraîches. La lyophilisation, ne réduisant pas significativement la quantité et/ou la qualité des composés, semble être également un bon moyen pour conserver la biomasse pour *S. muticum* et *P. littoralis*. En plus de ne pas avoir d'effet négatif cette méthode reste la plus pratique pour la conservation à long terme des échantillons qui pourront par la suite être stockés plus facilement (gain de place, possibilité de réduction en poudre, pas besoin de maintenir la biomasse au frais). De plus, les composés thermosensibles sont particulièrement bien préservés lors de la lyophilisation. Les différences de comportement observées entre les espèces face aux différents conditionnements peuvent s'expliquer, soit par une différence de structure entre les composés phénoliques des différentes espèces, ou alors par leur simple morphologie ou par leur physiologie (Le Lann *et al.*, 2008a). Ainsi, des algues aux thalles plutôt fins comme *P. littoralis* pourraient être plus sensibles à l'augmentation de la température lors des différents types de séchage. Les composés se retrouvent de manière générale moins protégés, que ce soit dû au fait qu'ils sont liés plus intimement avec la paroi ou parce qu'ils sont plus sensibles à la chaleur. Le même constat peut être fait pour *S. muticum* qui semble plus sensible qu'*A. nodosum* aux conditions de séchage. Comme déjà proposé par Le Lann *et al.* (2008a), la morphologie des algues a certainement un rôle dans la protection des composés. A titre d'exemple, les composés présents chez *A. nodosum* sont certainement plus protégés que dans le cas de *P. littoralis*, étant donné l'épaisseur de son thalle. En revanche, l'épaisseur du thalle peut à l'inverse devenir un inconvénient et expliquer la sensibilité d'*A. nodosum* à la lyophilisation. En effet, toujours dans le cas de thalles épais, l'eau étant moins facilement disponible à la sublimation cela pourrait conduire à une lyophilisation incomplète du thalle et donc à une dégradation des composés les plus sensibles. D'un autre côté, la diminution des teneurs en composés phénoliques dans les extraits d'algues lyophilisées d'*A. nodosum* pourrait être due à un changement de conformation native des molécules lors de la lyophilisation pouvant conduire à une diminution de leurs activités (ce phénomène n'est pas propre à *A. nodosum*) (Franks, 1998) Une alternative serait de découper le thalle en morceaux de petite taille avant lyophilisation dans le cas d'*A. nodosum*.

b) Effet du broyage sur la qualité de l'extraction de CP

Cette étude montre un réel effet du broyage des algues lyophilisées avant utilisation. Pour deux des espèces étudiées il y a une diminution importante de la qualité et de la quantité de composés phénoliques extraits lorsque les algues préalablement lyophilisées sont broyées un ou deux ans avant utilisation. Ce constat n'est néanmoins pas général. En effet chez *A. nodosum*, le broyage juste avant ou longtemps avant utilisation ne semble pas causer de dégradation ou de disparition des composés. Cela peut s'expliquer par la nature des algues utilisées, et de leur résistance au broyage : il est possible que l'épaisseur de la paroi cellulaire ou même du thalle en lui-même ne permette pas d'obtenir des particules aussi fines que dans le cas de *S. muticum* et *P. littoralis* et que cela protège en quelque sorte les composés d'une possible dégradation oxydative. Il a ainsi été démontré que les composés phénoliques peuvent s'oxyder facilement en présence d'oxygène ce qui pourrait expliquer ces résultats (Glombitza et Rösener, 1974). Aucune étude n'a montré un tel effet de la taille des particules ou encore de la conservation sous forme poudre des algues lyophilisées. Il serait intéressant d'affiner cette étude en vérifiant l'effet de la

taille des particules ou encore en conservant les échantillons en l'absence d'oxygène, sous gaz neutre. Il serait en effet judicieux, afin de conserver l'activité des poudres d'algues de les conditionner sous azote ou sous vide et à l'obscurité pour éviter l'oxydation.

II.2.4.2. Influence des conditions opératoires sur l'efficacité de l'extraction solide/liquide classique

a) Effet du solvant et variabilité interspécifique

Les différences observées entre les trois espèces étudiées peuvent s'expliquer. Les algues contiennent rarement un seul type de composé phénolique, on parlera davantage d'un « pool » de composés. Ces composés peuvent avoir différentes conformation (*cf.* Chapitre I), polarités, taille,.. selon les liaisons engagées entre les unités de phloroglucinol, la polarité des composés sera différente, ils n'auront donc pas la même affinité envers tel ou tel solvant. Les composés phénoliques peuvent avoir des polarités différentes mais sont souvent relativement polaires voire légèrement apolaires ce qui les rend miscibles dans des solutions plutôt aqueuses ou dans des solvants peu apolaires tels que l'éthanol, l'acétone ou encore très polaire tel que le méthanol (Plouguerné, 2006 ; Connan, 2004 ; Le Lann, 2009; Jégou, 2011). C'est le cas ici pour *S. muticum* et *A. nodosum*, pour lesquels le mélange le plus efficace est l'acétone-eau (50 :50 v/v). Pour *P. littoralis,* les composés phénoliques ont une grande affinité pour l'eau qui est un des solvants les plus efficaces mais aussi et surtout pour le mélange AE-eau. L'AE étant plus polaire que l'acétone ou l'éther et non miscible avec l'eau ; les CPs ayant une grande affinité pour l'eau sont extraits ainsi que ceux pouvant être liés à des composés plus apolaires tels que certains lipides des parois cellulaires. D'autre part, il apparaît que les solvants permettant d'obtenir une fraction riche en CP (*cf.* Figure II.12) ne permettent pas forcément d'extraire la majorité des composés présents dans l'algue. **Le solvant à choisir va donc dépendre de l'application souhaitée**.

Dans le cas où le but est d'obtenir de grandes quantités de CP on choisira plutôt un mélange acétone-eau ou AE-eau pour le cas particulier de *P. littoralis*. Dans le cas où l'objectif serait, en vue d'une future purification d'avoir déjà une fraction constituée en majorité de composés phénoliques, on préférera plutôt l'acétone pure.

b) Effet croisé de Solvant/Durée/Température chez *Sargassum muticum*

Cette étude a montré la nécessité d'effectuer une étude préliminaire afin de déterminer la meilleure combinaison Solvant/Durée/Température d'extraction pour une algue donnée. Très peu de travaux se sont intéressés à l'effet combiné de ces trois facteurs (Pompeu *et al.,* 2009; Kukula-Koch *et al.*, 2013) et aucun ne concerne les algues.

Nous avons vu ici que chacun des paramètres agit sur le contenu phénolique. Premièrement, l'effet du solvant est très important, il devra d'une part permettre l'extraction de la majorité des composés phénoliques contenus dans l'algue d'autre part limiter l'extraction de

composés indésirables pour permettre l'obtention d'une fraction enrichie en CPs. **L'acétone semble ici le solvant le plus indiqué**. **La durée d'extraction quant à elle peut être fixée à 2h**. Au-delà aucune amélioration de la quantité de CP n'est observée. **La température d'extraction la plus efficace est 40°C**, même si certains auteurs préconisent les températures ambiantes moins dénaturantes (Chandini *et al.,* 2008; Lopez *et al.,* 2011), d'autres montrent au contraire un effet positif de l'augmentation de la température (Pompeu *et al.,* 2009; Rodríguez-Meizoso *et al,.* 2010; Tanniou *et al.,* 2013a). Les résultats de notre étude doivent être discutés au regard de l'utilisation future des extraits. Ainsi, **pour une purification future, on choisira l'acétone permettant d'obtenir des fractions constituées à plus de 50% de CP**. En revanche, **pour une utilisation commerciale des extraits en tant qu'ingrédient, une extraction à l'éthanol permettrait de répondre aux normes européennes REACH et IPPC tout en permettant l'obtention d'une fraction riche en CP actifs**.

II.2.4.3. Conclusion sur l'extraction Solide-liquide

L'extraction solide-liquide est donc un procédé simple, rapide à mettre en place et permettant d'obtenir des fractions aux activités comparables à celles des produits antioxydants disponibles sur le marché. Dans ces travaux présentés, nous avons vu l'importance de chacun des paramètres pouvant influencer la qualité d'une extraction. Dans un premier temps, la nature du solide est très importante ; aussi il faudra être attentif au mode de conditionnement et à la conservation de la matière première. Nous avons vu ici que la lyophilisation reste le moyen le plus simple pour la conservation à long terme de la biomasse et aussi un de ceux permettant la conservation de CP actifs. Nous avons également vu qu'il est important de ne pas broyer l'algue juste après lyophilisation, cela pouvant causer une perte en termes de quantité et de qualité des CP contenus dans les échantillons. Ensuite, nous avons mesuré l'importance de la définition des paramètres d'extraction, qui sont : la nature du solvant, la durée et la température d'extraction. Ces trois paramètres agissant en synergie, il est important d'étudier une combinaison de facteurs et non pas opérer paramètre par paramètre comme il est couramment fait dans la littérature. Enfin, et surtout, nous avons vu qu'il n'existe pas de protocole standard pour l'extraction de CP. En effet, il faut adapter le protocole à l'espèce choisie, la qualité de l'extraction en étant hautement dépendante. Cependant, l'extraction solide-liquide reste un procédé relativement lent ; les durées d'extraction étant souvent de l'ordre de plusieurs heures. De plus, cette technique, pour qu'elle soit la plus efficace, nécessite le plus souvent l'emploi de solvants toxiques, en grande quantité, ce qui rend les extraits inappropriés pour une utilisation en alimentaire ou cosmétique.

Il existe néanmoins des procédés plus « éco respectueux », déjà utilisés pour l'extraction de biomolécules variées à partir des algues (Plaza *et al.,* 2010). En particulier l'extraction par fluide supercritique (SFE), l'extraction par liquide pressurisé (PLE) ou encore l'extraction de partage centrifuge (PCE) qui pourraient être utilisés pour cette classe de composés (Onofrejová *et al.,* 2010; Plaza *et al.,* 2010; Hamzaoui *et al.,* 2011; Taamalli *et al.,* 2012 ; Tanniou *et al.,* 2013a). L'avantage majeur de ces procédés est l'utilisation de solvants non toxiques ou des faibles volumes de solvants et des temps d'extraction plus courts que d'autres procédés. Ils

permettent souvent de meilleurs rendements d'extraction. Ces procédés ont donc été testés sur la macroalgue *S. muticum*.

II.3. Procédés alternatifs utilisés pour l'extraction des phlorotannins

Les trois techniques d'extraction alternatives citées plus haut : l'extraction de partage centrifuge (EPC) dérivée de la CPC (Chromatographie de Partage Centrifuge) et l'extraction par fluide haute pression ou supercritique (PLE et SFE) ont été testées sur la macroalgue *Sargassum muticum* et comparées entre elles. On en déduira quels sont les procédés les plus satisfaisants en termes d'efficacité d'extraction et de respect de l'environnement. Le but étant ici de démontrer leur intérêt face à l'extraction solide-liquide « classique », celle-ci sera utilisée comme référence dans cette étude.

II.3.1. Généralités

II.3.1.1. Extraction de Partage Centrifuge (EPC)

a) Qu'est ce que la CPC ?

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) est une technique de séparation de molécules apparue il y a une trentaine d'années. La colonne chromatographique est généralement constituée d'une succession de cellules en série (Figure II.13), placées sur un rotor, et reliées entre elles par de fins canaux. Sous l'action d'un champ de force centrifuge généré par la mise en rotation de la colonne chromatographique, une phase liquide, appelée alors phase stationnaire, va pouvoir être immobilisée dans l'appareil. Une autre, par opposition appelée phase mobile, transporte la solution étudiée.

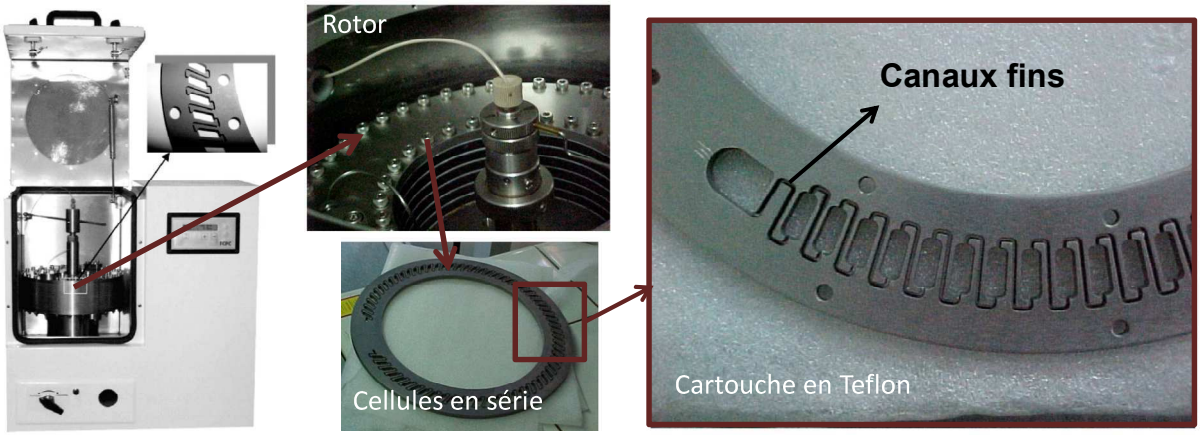


Figure II. 13. Description d'un appareil de CPC : Kromaton Technologies FCPC® 200mL (d'après Delannay *et al.*, 2006)

Dans chaque cellule règnent des conditions hydrodynamiques favorables au partage des solutés entre chaque phase, selon leurs propriétés physico-chimiques et leurs affinités respectives

vis-à-vis des deux phases. Les temps d'élution seront donc variables pour chaque soluté et permettront de ce fait leur séparation. Il est important de noter que dans ce manuscrit nous parlerons préférentiellement d' « EPC » pour « Extraction de Partage Centrifuge » et non de « CPC » l'emploi de la CPC à proprement parler concernant d'avantage la séparation de molécules d'intérêt dans un but analytique et non simplement leur extraction.

b) Les paramètres du procédé

Ce procédé nécessite l'utilisation de solvants non miscibles afin de se trouver en présence d'un système biphasique. Les propriétés physiques des deux phases en termes de viscosité et de masse volumique vont influencer l'hydrodynamique alors que leurs propriétés physico-chimiques définissant l'affinité mutuelle des deux phases en termes de polarité et de chacune d'elles pour les solutés gouverneront la répartition des solutés dans chacune des phases. Le rapport entre le volume de phase mobile et le volume de phase stationnaire a aussi une grande importance. Il faut donc sélectionner les solvants qui composent chacune des phases et leurs proportions, l'efficacité du procédé en dépendant. Cette phase d'optimisation requiert un certain temps. Pour faciliter le choix des ingénieurs, des méthodes génériques ont été développées. Une batterie de tests sur une gamme de solvants de compositions variables (de polarité croissante généralement), permet par exemple d'avoir un aperçu des propriétés du système biphasique à choisir (Foucault et Chevolot, 1998). Du point de vue des conditions opératoires on peut travailler principalement avec le débit de phase mobile et la vitesse de rotation de la colonne. Plusieurs études et essais de modélisation ont permis de caractériser les courbes de tendance de l'influence de ces deux paramètres sur l'efficacité du procédé. Le nombre de cellules, leur volume ainsi que les propriétés physiques du matériau qui constitue leur paroi interne sont bien entendu à prendre en compte.

c) Les différents modes de fonctionnement et d'élution

De même qu'en chromatographie classique, on peut séparer, soit en gardant constante la composition en solvant dans chaque phase (mode isocratique), soit en changeant leur composition (vers un mélange plus polaire, par exemple) au cours de l'élution, mode à gradient d'élution. En effet, lorsque plusieurs composés ont des temps d'élution différents, ce dernier mode permet d'éluer plus rapidement les derniers composés restant dans la colonne (ceux ayant des temps d'élutions plus importants), en augmentant leur affinité avec la phase mobile par le changement de sa composition.

Le sens de rotation de la colonne chromatographique permet de rendre mobile la phase stationnaire et stationnaire la phase mobile. Le mode d'élution sera ainsi déterminé par le choix de la phase mobile (Figure II.14). Lorsque la phase mobile sera la phase la plus dense on parlera de mode « descendant » la phase stationnaire sera alors traversée dans le sens de la force centrifuge. A l'inverse lorsque la phase la moins dense sera utilisée comme phase mobile on parlera de mode « ascendant » la phase stationnaire sera donc traversée à l'inverse du champ de force centrifuge (Figure II.14). On peut ainsi travailler avec différents modes de fonctionnement.

Les plus utilisés sont le mode d'élution-extrusion (Berthod *et al.*, 2005a) et le mode dual (Agnely et Thiébaut 1997 ; Delannay *et al.*, 2006). Lors du mode d'élution-extrusion, après une période d'élution classique, de la phase stationnaire fraîche est utilisée afin de pousser la phase mobile puis la phase stationnaire hors de la colonne ; ce qui permet, en éliminant les deux phases, de collecter l'ensemble des molécules présentes dans l'échantillon. Le volume de solvant normalement nécessaire à l'élution des molécules ayant une forte affinité pour la phase stationnaire est ainsi diminué. Le mode dual permet également de réduire considérablement la consommation de solvants, mais son principe est différent. En effet, après une période d'élution classique, le sens de rotation est inversé. La phase initialement stationnaire devient alors la phase mobile, la phase mobile devenant stationnaire, ce qui permet d'éluer en sens inverse les composés d'intérêt en un temps réduit. Ainsi, alors que dans le cas de l'élution-extrusion la séparation s'arrête à la fin de l'étape d'élution, le mode dual permet la séparation des molécules en continu jusqu'à leur sortie de la colonne.

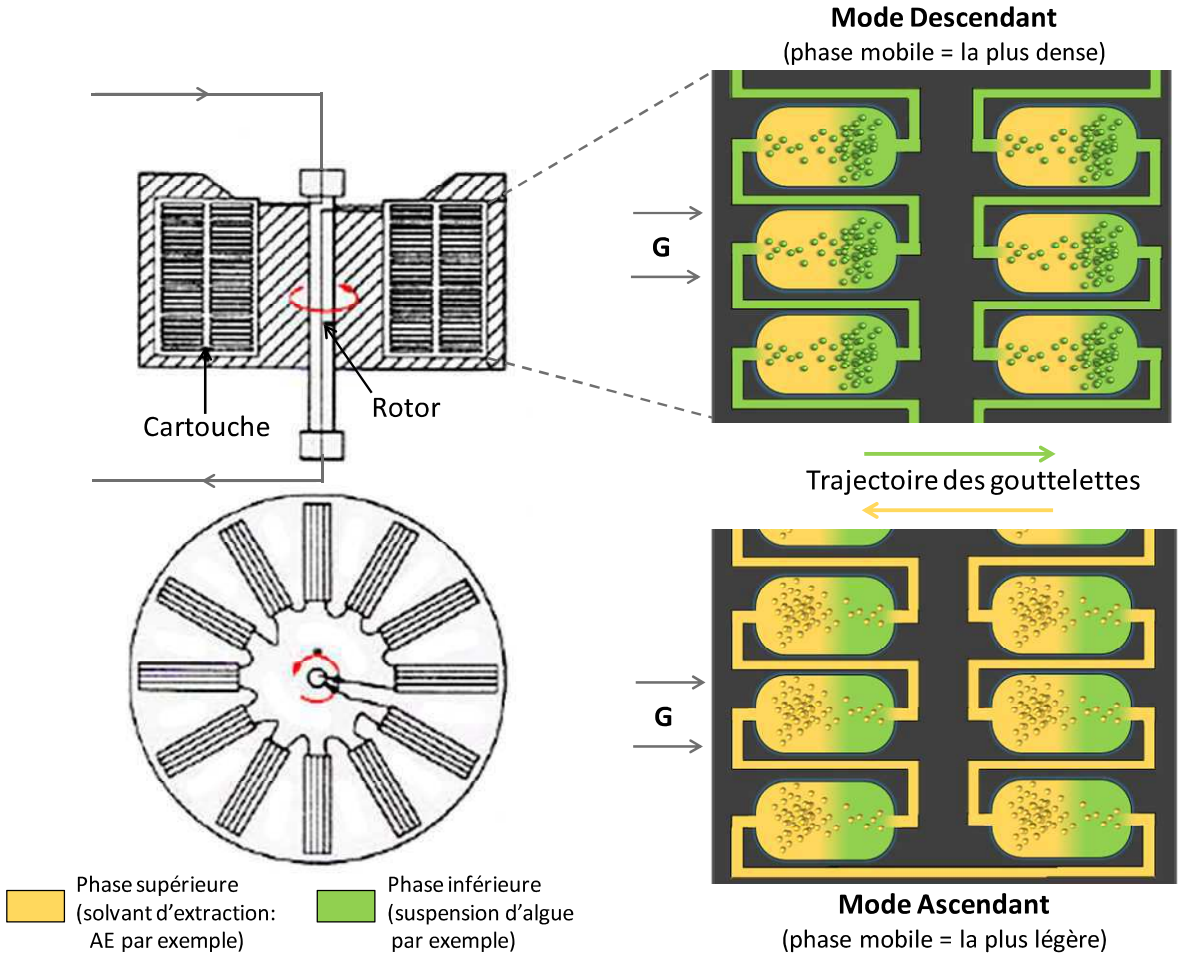


Figure II. 14. Schéma de principe de l'EPC en mode ascendant et descendant sous un champ d'accélération g. Modifié d'après Delannay *et al.*, 2006 .

d) Applications actuelles de la CPC à l'extraction de biomolécules

L'EPC ne connaît actuellement aucune application à l'extraction de composés polaires, de type phénolique. Cette technique est beaucoup plus utilisée pour l'extraction de composés apolaires, de type acides gras, terpènes, etc… Beaucoup de travaux concernent les microalgues Ainsi des acides gras polyinsaturés (AGPI) ont été extraits d'huile saponifiée par méthanol de *Skeletonema costatum*, (Bousquet *et al*., 1994). Plus couramment, la majorité des auteurs utilise la CPC pour des étapes de purification de molécules. On peut citer par exemple l'utilisation de la CPC pour la purification de pigments de type caroténoïde, ou l'extraction de lutéine à partir de *Chlorella vulgaris* (Li *et al.*, 2001a), d'astaxanthine à partir d'un extrait *Chlorococcum sp* (Li *et al.*, 2001b) et de zéaxanthine, d'un extrait de *Microcystis* (Chen *et al.*, 2004). Si la CPC et ses performances semblent attractives pour la valorisation de biomolécules, dans l'industrie, on lui préfère encore majoritairement l'extraction Solide-Liquide classique ; pour des raisons de coût et de capacité de production.

II.3.1.2. Extraction par fluide pressurisé et fluide supercritique

Le développement de méthodes d'extraction alternatives faisant intervenir des fluides compressés comme agents extracteurs telles que l'extraction par fluide pressurisé (PLE, Pressurized Liquid Extraction), l'extraction par eau subcritique (SWE, Subcritical Water Extraction) et l'extraction par fluide supercritique (SFE, Supercritical Fluid Extraction) se répand depuis quelques années avec plusieurs domaines d'application, notamment pour l'extraction de biomolécules d'intérêts à partir de végétaux supérieurs, de micro/macroalgues, incluant les cyanobactéries. Ces techniques offrent de nombreux avantages d'un point de vue du temps d'extraction, de la consommation en solvant et du rendement, tout en permettant l'extraction de composés actifs. Quelques exemples de ce qui se fait actuellement dans le domaine de l'extraction de biomolécules d'intérêts à partir de procédés utilisant des fluides compressés sont rassemblés dans le tableau II.3.

Tableau II. 3. Exemples d'utilisation de techniques à haute pression pour l'extraction de molécules naturelles actives. PLE : Pressurized Liquid Extraction ; SWE : Subcritical Water Extraction; ASE : Accelerated Solvent Extraction et SFE : Supercritical Fluid Extraction.

Technique utilisée	Modèle utilisé	Etudes correspondantes
PLE	Plantes supérieures	Taamalli *et al* ., 2012; Borras linares *et al.,* 2011; Miron *et al.,* 2011; Herrero *et al.,* 2005
	Microalgues-cyanobactéries	Onofejova *et al* ., 2010; Plaza *et al* ., 2010; Santoyo *et al* ., 2009; Herrero *et al* ., 2004
	Macroalgues	Onofejova *et al* ., 2010; Plaza *et al* ., 2010
SWE	Plantes supérieures	Rodriguez-Meizoso *et al* ., 2006
	Microalgues-cyanobactéries	Rodriguez-Meizoso *et al.,* 2010
ASE	**Macroalgues**	Zubia *et al.,* 2009
SFE	Plantes supérieures	Borras linares *et al.,* 2011; Leal *et al.,* 2010; Herrero *et al.,* 2006; Taamalli *et al.,* 2012; Kukula-Koch *et al.,* 2013
	Microalgues-cyanobactéries	Klejdus *et al* ., 2009; Mendiola *et al* ., 2008a,b
	Macroalgues	Hattab *et al* ., 2007

a) Extraction par fluide pressurisé (PLE, Pressurized Liquid Extraction)

La PLE (extraction par liquide pressurisé) est une technique d'extraction solide-liquide qui a la particularité d'utiliser des solvants à hautes pressions et à des températures situées au-dessus de leur point d'ébullition (Richter *et al.*, 1996). La sélectivité du procédé dépend du solvant utilisé. On a donc, comme pour l'extraction solide-liquide « classique » accès à une large gamme de polarités de solvants et donc de molécules. Une des variantes les plus connues de ce procédé est l'extraction accélérée par solvant (Accelerated Solvent Extraction, ASE). Cette combinaison de pression et température élevées fournit un processus d'extraction plus rapide et plus efficace. L'augmentation de la température diminue la viscosité des solvants permettant une meilleure pénétration dans la matrice solide et des interactions plus faibles entre le solvant, la matrice et les molécules. Ainsi, la solubilité des composés dans des liquides pressurisés et la vitesse de désorption des composés fixés à la matrice sont augmentées. De plus, à température élevée, les taux de diffusion deviennent plus rapides ce qui diminue le temps d'extraction. La pression, en forçant le solvant à passer à travers les pores de la matrice, permet d'atteindre les composés les moins accessibles. L'extraction se déroule en différentes étapes comme indiqué sur la Figure II.15). Dans un premier temps, l'échantillon solide est placé dans un récipient fermé sans oxygène et sans lumière. Le récipient est ensuite rempli avec le solvant d'extraction et chauffé à une température supérieure au point d'ébullition du solvant, ce qui permet d'augmenter facilement la pression dans la cellule d'extraction. Le processus d'extraction peut être constitué de plusieurs cycles, l'introduction de solvant propre augmentant le gradient de concentration entre le solvant et la matrice solide, ce qui permet d'augmenter le transfert de masse ; le taux d'extraction sera donc amélioré. Le solvant est mis au contact de la matrice pendant une durée fixée au préalable (souvent 5 à 20 minutes), on parlera alors de mode « statique » durant lequel auront lieu la désorption et la diffusion des composés de l'échantillon dans le solvant (Richter *et*

al., 1996 ; Kaufmann et Christen, 2002). A la fin de l'extraction, l'extrait est rincé de la cellule d'extraction, purgé de haut en bas avec l'azote et collecté. Lors de l'extraction, l'échantillon est introduit dans une cellule en acier inoxydable qui contient deux filtres en cellulose positionnés dans les parties basse et haute de celle-ci (Figure II.15). Ainsi, l'extrait obtenu est filtré avant d'être récupéré dans un flacon ce qui élimine l'étape de filtration (Romanik *et al.*, 2007).

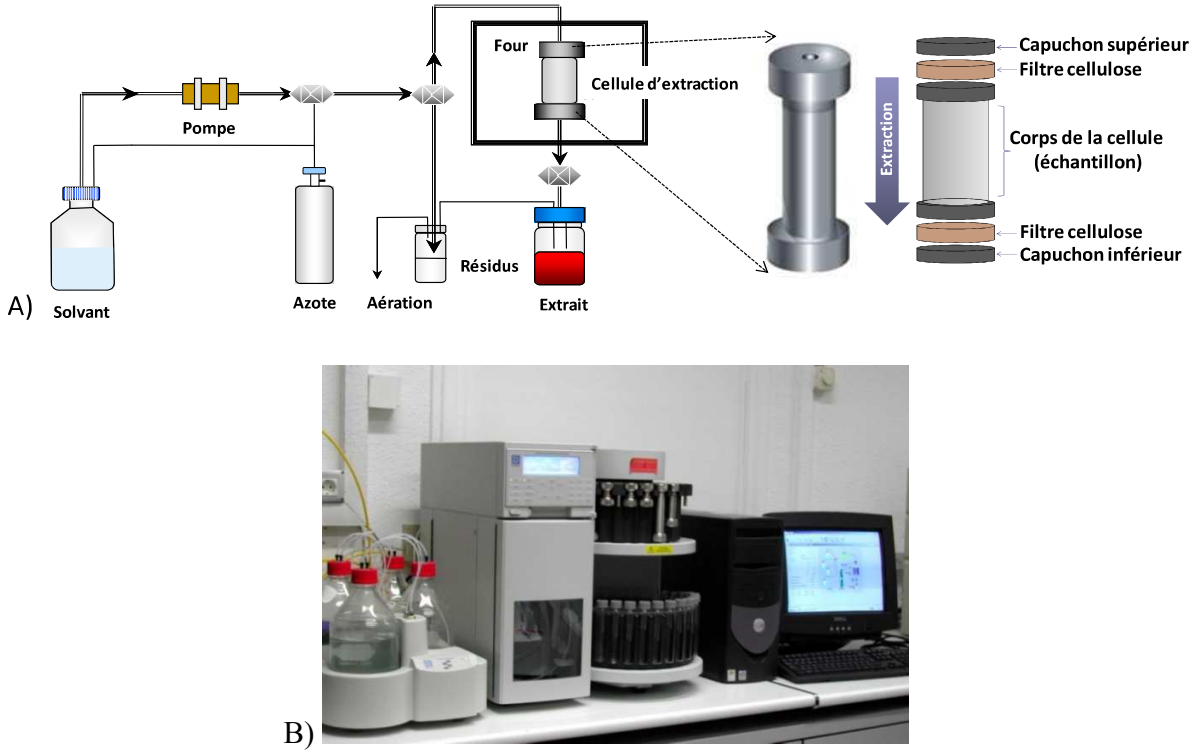


Figure II. 15. Système PLE utilisé dans notre étude. A) Schéma du système PLE utilisé (d'après Herrero *et al.* 2006) et détail simplifié d'une cellule d'extraction PLE. B) Vue d'ensemble du système PLE utilisé, piloté par informatique.

Comme pour tout procédé, suivant les applications, plusieurs paramètres doivent être pris en compte : température d'extraction, pression et solvant à utiliser.

Pour l'extraction de composés phénoliques chez les plantes supérieures et les algues, on utilise généralement de courtes durées d'extraction de 9 à 20 min et des températures comprises entre 50 et 200°C (Tableau II.4). La pression d'utilisation est souvent proche de 103 bars mais peut atteindre des valeurs jusqu'à 130 bars selon les auteurs (Onofrejova *et al.*, 2010). La température est le paramètre le plus testé par les auteurs (Borras linares *et al.*, 2011 ; Miron *et al.*, 2011 ; Herrero *et al.*, 2004), la pression et la température étant souvent fixées durant les études. Des effets positifs de la durée et de la température d'extraction ont été reportés (Herrero *et al.*, 2004 ; Plaza *et al.*, 2010). En effet plus ceux-ci augmentent plus l'efficacité du procédé augmente.

Tableau II. 4. Conditions d'extraction des composés phénoliques pour différents matériels d'origine végétale. ns= non spécifié

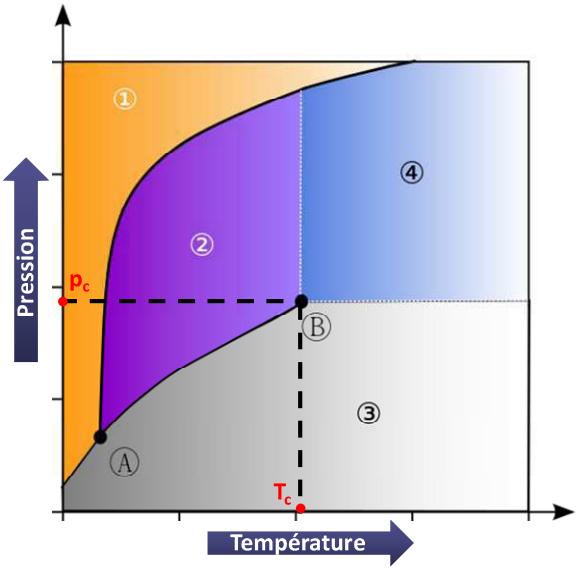
	Auteurs	Matériel	Solvant	Temps	Température	Pression
PLE	Borras linares *et al* ., 2011	Plantes supérieures	éthanol, eau	20 min	150°C (avec éthanol) ; 100,200°C (avec eau)	ns
	Miron *et al* ., 2011	Plantes supérieures	éthanol, eau, éthanol· eau	20 min	50,100,150,200°C	103 bar
	Taamalli *et al.,* 2012	Plantes supérieures	hexane	20 min	100°C	120 bar
	Onofrejova *et al.* , 2010	**Algues**	2 étapes: acétone/hexane 1:1 (v/v) puis méthanol/eau 80:10 (v/v)	**15 min**	130°C	130 bar
	Herrero *et al.,* 2004	**Algues**	hexane, pétrole brut léger, éthanol, Eau	**9, 15 min**	115, 170°C	103 bar
ASE	Zubia *et al* ., 2009a,b	**Algues**	DCM/MeOH 1:1 (v/v)	14 min	75°C	103 bar

Il existe également une autre variante de l'ASE et donc de la PLE : la SWE (Supercritical Water Extraction - Extraction à l'eau supercritique) dans laquelle de l'eau chaude est utilisée à des températures comprises entre 100°C (point d'ébullition de l'eau) et 374.1°C (point critique de l'eau). C'est l'application de fortes pressions qui permet de maintenir l'eau dans un état liquide (Ong *et al.*, 2006 ; Kronholm *et al.,* 2007). A température ambiante, l'eau est un solvant polaire mais lorsqu'elle est dans son état supercritique, c'est-à-dire chauffée entre 250-300°C dans une atmosphère pressurisée, sa polarité diminue et devient équivalente à celle du méthanol ou de l'éthanol (Teo *et al.,* 2010). Ainsi la SWE permet l'extraction de molécules moyennement polaires à non-polaires sans utiliser de solvants organiques. De plus, une augmentation de la température permet une diminution de la viscosité et des tensions de surface et donc une meilleure pénétration du solvant dans la matrice et une meilleure solubilisation des molécules (Teo *et al.*, 2010). La SWE nécessite le même matériel que l'ASE et peut également être utilisée en mode statique ou dynamique. Cependant, compte tenu des très hautes températures utilisées, la SWE ne sera que peu adaptée aux composés thermosensibles.

b) Extraction utilisant des fluides supercritiques

La singularité de l'état d'un fluide supercritique nécessite sa définition préalable et la description de ses principales caractéristiques. Un fluide est dit à l'état supercritique lorsqu'il est soumis à des conditions physiques bien spécifiques. Les corps purs peuvent se trouver soit à l'état solide, soit à l'état liquide, soit à l'état gazeux. Dans le diagramme température-pression présenté en Figure II.16, les régions correspondant à ces trois états sont séparées par les courbes de changement d'état concourantes au point triple (PT). Cet état particulier qu'est l'état supercritique est atteint pour une pression et une température supérieure respectivement à la pression critique (p_c) et la température critique (T_c) de ce fluide. Il se trouve que la courbe de vaporisation (liquide-gaz) présente un point d'arrêt dit point critique (PC) correspondant à un

couple de pression-température (p_c, T_c) assez facile à atteindre pour la plupart des composés organiques simples. Les propriétés physiques de ce fluide se situent alors entre celles d'un liquide et celle d'un gaz (Mendes *et al.*, 2003) lui conférant les avantages respectifs de ces deux états. Sa faible viscosité, son fort coefficient de diffusion dans un solide, par rapport à l'état liquide d'une part, et sa densité supérieure à celle de l'état gazeux, en font un fluide au potentiel de solvant extracteur très intéressant (Camel, 2001 ; Wang et Weller, 2006).



Sur l'axe des X se trouve la température en Kelvin et sur l'axe des Y on retrouve la pression en bar.

Légende:

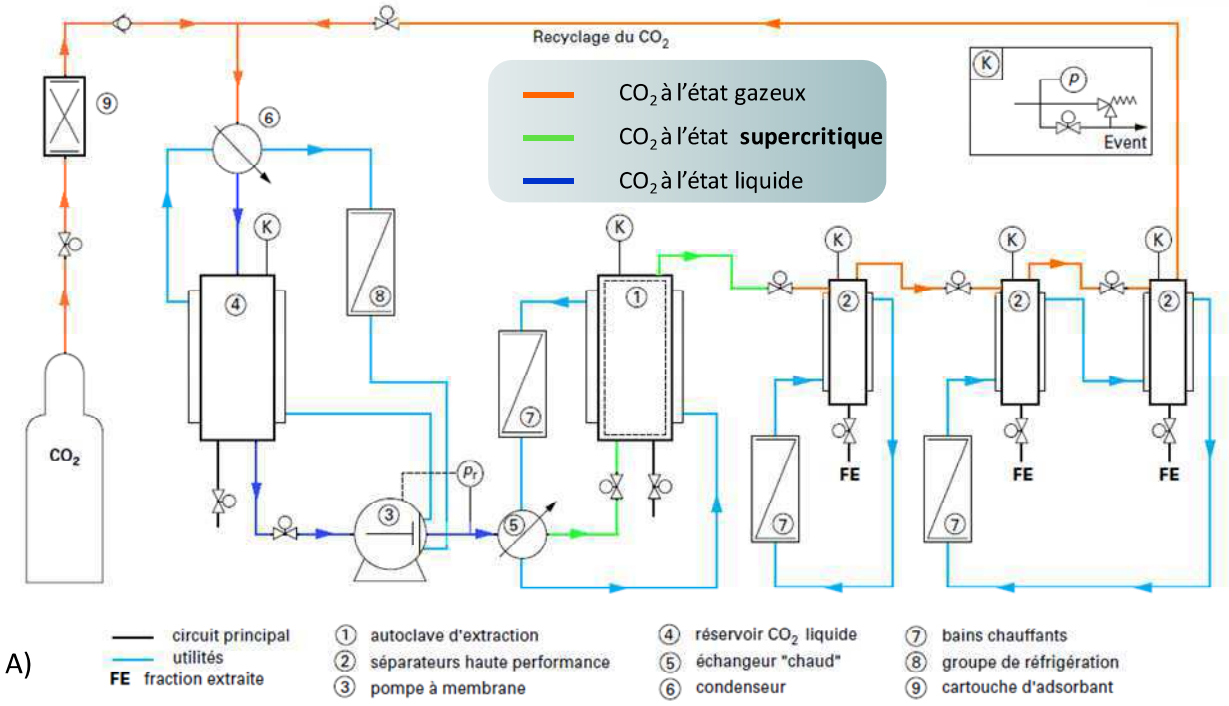
- 1: phase solide
- 2: phase liquide
- 3: phase gazeuse
- 4: phase fluide supercritique
- A: point triple (PT)
- B: point critique (PC)

Figure II. 16. Diagramme de phase représentant les changements d'états d'un fluide et décrivant l'état « supercritique » d'un fluide donné. D'après [4][7].

Le solvant le plus largement utilisé à l'état supercritique est le dioxyde de carbone. Ses propriétés, notamment ses coordonnées critiques (Tc = 31 °C, pc = 7.38 MPa), permettent son emploi à des températures proches de la température ambiante. Il est donc particulièrement indiqué pour le traitement de produits thermolabiles. Ininflammable, inerte chimiquement et non-toxique il est en fait un candidat idéal pour des applications agroalimentaires, l'utilisation de l'extraction par solvant classique étant strictement réglementée par la législation. Le CO_2 est un solvant d'un grand intérêt par de nombreux aspects : largement présent dans l'atmosphère, il est facile à éliminer et peu coûteux (sous-produit de l'industrie). Ce qui a, de ce fait, encouragé sa diffusion dans l'industrie pour des opérations d'extraction solide-liquide au détriment des techniques d'extraction « classiques », malgré d'importants coûts de fonctionnement et d'investissement. Une autre des caractéristiques intéressantes de ce procédé est qu'on peut moduler le pouvoir solvant du fluide supercritique en modifiant les valeurs de pression et/ou de température ce qui rend l'extraction au CO_2 supercritique hautement sélective. Cependant, l'un des désavantages majeurs de l'extraction par CO_2 supercritique est l'hydrophobicité de ce composé qui limite l'extraction à des molécules apolaires (liposolubles tels que les huiles essentielles et huiles végétales) et qui nécessite l'ajout de co-solvants comme le méthanol ou

[7] Référence électronique indexée en fin de manuscrit

l'éthanol pour permettre l'extraction de molécules plus polaires (Herrero *et al.*, 2010 ; Luque de Castro et Jiménez-Carmona, 2000).



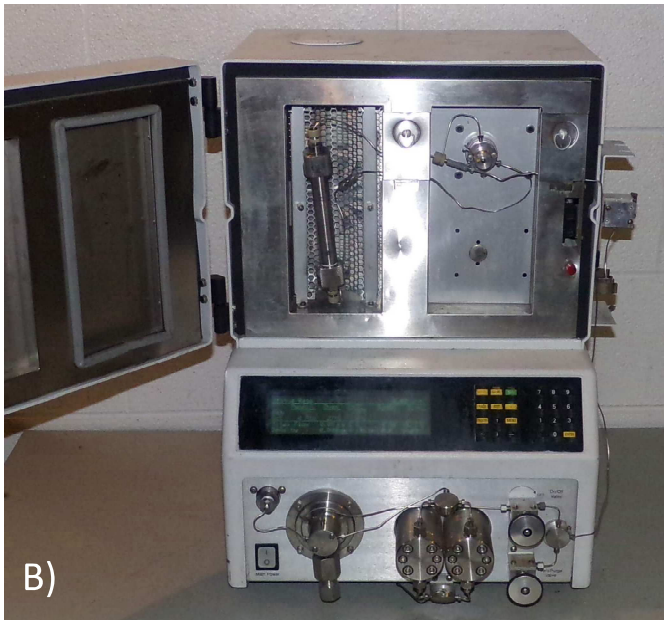


Figure II. 17. A) Schéma de procédé d'une installation SFE pilote de taille moyenne (d'après Perrut, date) et B) Système SFE utilisé à l'échelle analytique : extracteur de type Suprex (Isco) PrepMaster.

Durant le processus d'extraction, le CO_2 est pompé sous forme de liquide à partir d'une cuve de stockage (4 sur la Figure II.17), il dépasse sa $P_{critique}$ en sortie de pompe (3) puis passe dans un

échangeur chaud (5) où il va atteindre sa $T_{critique}$ et ainsi passer en phase supercritique. Le CO_2 passe ensuite à travers l'autoclave extracteur sous pression (1) rempli avec la matière première à traiter et va entrainer avec lui les éléments à extraire. La pression du mélange diminue au passage au travers d'un détendeur ce qui va permettre au CO_2 de repasser en phase gazeuse dans le/les séparateurs (2). Le CO_2 (gaz) ne possède plus de propriétés de solvant et se sépare des éléments extraits. L'extrait est alors récupéré par gravité dans la partie basse du séparateur (FE). Il existe souvent plusieurs séparateurs ce qui permet de récolter différentes fractions. Le CO_2, lui, passe au travers d'un échangeur froid ou un condensateur (6) et redevient liquide. Il peut ainsi être recyclé (95%) et être réinjecté dans le circuit pour une nouvelle extraction.

Considérons maintenant l'utilisation de cette technique pour la valorisation des métabolites provenant de biomasses végétales ou algales. A partir des années 90, un intérêt important fut porté sur l'utilisation de l'extraction par CO_2 supercritique pour la valorisation de composés lipophiles tels que les acides gras polyinsaturés (AGPI) et les caroténoïdes de microalgues. L'étude de faisabilité de l'extraction-purification de caroténoïdes (astaxanthine et cantaxanthine) issus de *Chlorella vulgaris* (Mendes *et al.*, 1995) avançait déjà des rendements d'extraction en pourcentage de matière sèche de l'ordre de 5%. La recherche d'un optimum en termes de pureté et de rendement d'extraction, a mis en évidence l'importance des conditions de pression et de température. Encore aujourd'hui la température et la pression d'extraction sont les paramètres dont l'effet sur l'efficacité d'extraction est le plus étudié (Mendiola *et al.*, 2008a,b). L'influence de ces paramètres n'est cependant pas clairement établie et dépend de chaque application. Les rendements d'extraction en caroténoïdes de *Chlorella vulgaris* augmentent avec la pression en CO_2 mais diminuent avec la température (Mendes *et al.*, 2003). Le même constat a été fait lors de l'étude de ces mêmes paramètres sur plusieurs espèces microalgales par Mendiola *et al.* (2008a,b) qui ont montré que l'augmentation de la pression avait un effet positif sur l'extraction. Au contraire, Jaime *et al.* (2007) ont montré que la température avait un effet négatif sur celle-ci. En revanche, les rendements d'extraction en β-carotène et en chlorophylle a, à partir de *Nannochloropsis gaditana*, augmentent par rapport à la température, et suivent une courbe parabolique par rapport à la pression (avec un optimum à 400 bars pour une température utilisée de 60°C) selon Macias-Sanchez *et al.* (2005). Les températures d'extraction avoisinent la plupart du temps 40°C (Tableau II.5) mais peuvent atteindre des valeurs jusqu'à 120°C. Les pressions employées, quant à elles, varient d'une étude à l'autre, de 100 à 400 bars (Tableau II.5). De même, les durées d'extraction utilisées varient énormément d'un auteur à l'autre, de l'ordre de la minute (Hattab *et al.,* 2007 ; Klejdus *et al.,* 2009) jusqu'à plusieurs heures (Leal *et al.,* 2010 ; Kukula-Koch *et al.*, 2013). Les modificateurs de polarité dénommés co-solvants tels que l'éthanol sont souvent employés lors de l'extraction de composés plutôt polaires tels que les composés phénoliques (Borras linares *et al.,* 2011 ; Taamalli *et al.,* 2012 ; Kukula-Koch *et al.,* 2013). L'utilisation de solvants de nature différente du CO_2, plus polaires, en petites quantités, permet d'accroître significativement le rendement d'extraction d'acide γ-linoléique chez *Arthrospira platensis* (Mendes *et al.*, 2003). Suite à des études présentant des rendements peu satisfaisants pour un changement d'échelle, d'autres paramètres ont été testés : un prétraitement mécanique, un concassage manuel ou un broyage ont, par exemple, permis d'augmenter d'un

facteur trois, les rendements d'extraction en caroténoïdes de *Chlorella vulgaris* (Gouveia *et al.*, 2007). D'autre part, l'application d'un gradient de pression brutal lors de l'extraction d'astaxanthine de la levure *Phaffia rhodozyma* a multiplié par 4 et par 10, respectivement à 40°C et 60°C, les rendements d'extraction (Lim *et al.,* 2002).

Tableau II. 5. Conditions d'extraction des composés phénoliques pour différents matériels d'origine végétale. ns= non spécifié ; l'auteur en caractère gras a effectué son étude sur des macrolagues.

	Auteurs	Solvant	Temps	Température	Pression
SFE	Borras linares *et al* ., 2011	CO_2 seul ou modifié EtOH (6.6%)	*n.s.*	40°C	150 bar (etOH) et 400 bar (CO2 seul)
	Borges *et al* ., 2012	CO_2	240 min	40	150-300 bar
	Leal *et al* ., 2010	CO_2	3h	30 et 50°C	100, 200, 300 bar
	Klejdus *et al* ., 2009	CO_2	45-75 min	40-120°C	100-400 bar
	Taamalli *et al.* , 2012	CO_2 modifié EtOH (6.6%)	2h	40°C	150 bar
	Hattab *et al* ., 2007	CO_2	30 min	40°C	91, 104 bar
	Kukula-Koch *et al* ., 2013	CO_2 seul ou modifié	17,5h	50°C	100,200,300 bar

II.3.1.3. Utilisation des procédés pour l'extraction de composés phénoliques

Notre démarche vise à optimiser quantitativement et qualitativement l'extraction de phlorotannins actifs à partir de tissus algaux. Nous comparerons dans ce paragraphe les différentes méthodes mentionnées plus haut à la méthode d'extraction solide/liquide classiquement utilisée au laboratoire. Chacune de ces techniques présente un potentiel intéressant pour l'extraction de composés phénoliques. L'EPC est très largement utilisée pour l'extraction de produits naturels (Marston et Hostettmann, 2006; Pauli *et al*., 2008 ; Hamzaoui *et al*., 2011 ; Yoon *et al*., 2011). Cette technique est très attractive en termes de sélectivité, permet de traiter une grande quantité d'échantillon et d'être ensuite adaptée à grande échelle (Margraff *et al*., 2005 ; Sutherland *et al*., 2008 ; Toribio *et al*., 2009). La SFE opère à basse température dans des conditions exemptes d'oxygène et utilise le CO_2 dans son état supercritique comme agent extracteur. Ces caractéristiques rendent la SFE idéale pour l'extraction de composés antioxydants naturels. D'un autre coté, la PLE permet l'utilisation de n'importe quel type de solvant à haute pression et haute température à des volumes très faibles. Les temps d'extractions sont également très courts comparés aux procédés conventionnels. De plus, de hauts rendements d'extraction sont souvent atteints avec cette technique. Quand un procédé d'extraction « vert » et sélectif est désiré, des méthodes comme la SFE ou le PLE semblent les plus indiquées.

Nous avons donc mené différentes études afin de cerner les intérêts et possibilités qu'offrait chacun de ces procédés vis à vis de l'extraction de composés phénoliques actifs.

1) Dans un premier temps, l'extraction de partage centrifuge (EPC) a été testée sur deux espèces de macroalgues : *Sargassum muticum* et *Ascophyllum nodosum*. Nous voulions savoir si cette technique pouvait être appliquée à du matériel macroalgal et si elle permettait d'augmenter le rendement d'extraction des composés phénoliques recherchés. D'autre part, ces deux biomasses algales n'ayant pas la même viscosité une fois en suspension, cette première approche consistait à déterminer si cette technique était applicable à n'importe quel type de matériel algal.

2) Les deux techniques utilisant des liquides sous pression ou dans leur état supercritique (PLE et SFE) ont été testées sur les trois espèces de macroalgues brunes décrites au chapitre I : *S.muticum*, *A.nodosum* et *P. littoralis*. Le but étant, comme pour l'EPC, d'avoir une première idée de l'intérêt de ces techniques pour l'extraction de composés phénoliques et de leur faisabilité chez les trois espèces étudiées.

3) Enfin, afin de mettre en avant les qualités de ces procédés « alternatifs » face à l'extraction solide/liquide « classique » présentée plus haut (*cf.* II.2.), ces trois procédés ont été testés à nouveau sur une même biomasse riche en composés phénoliques : sur de la Sargasse récoltée en été. Les résultats ont ensuite été comparés à ceux obtenus sur une même biomasse par des techniques d'extraction solide/liquide « classiques ».

Le travail mené permettra de répondre à la question suivante :

Des techniques alternatives à l'extraction solide/liquide pour l'extraction de biomolécules actives à partir de biomasse végétale et algale peuvent-elles être utilisées de façon efficace pour l'extraction de composés phénoliques actifs à partir de *Sargassum muticum*?

II.3.2. Matériels et Méthodes

II.3.2.1. Extraction de Partage Centrifuge (EPC)

Cette partie du travail a pu se faire grâce à une collaboration avec Dr. Vandanjon et Dr. Marchal dans le cadre du projet COSELMAR. Les extractions de Partage centrifuge se sont déroulées dans le laboratoire du GEPEA, Saint-Nazaire .

a) Appareillage

Un extracteur de partage centrifuge a été utilisé pour cette étude. Il s'agit d'un prototype construit par Kromaton Technology (Annonay, France) pour le laboratoire GEPEA et utilisant les connaissances en EPC du laboratoire dans le domaine de l'hydrodynamique (Figure II.18). L'appareil est constitué d'un rotor de 7 disques circulaires gravés d'un total de 231 cellules jumelles asymétriques arrangées sur le pourtour du disque et connectées ensemble par de fins

canaux. La phase stationnaire est maintenue dans la colonne par la force centrifuge générée par la rotation autour d'un axe simple. Le volume de la colonne est de 279 mL. La vitesse de rotation a été ajustée de 200 à 1200 rpm, produisant ainsi une accélération proche de 160 g. La phase mobile est pompée à travers la phase stationnaire grâce à 3 pistons (Armen Instrument Preparative Pump, Vannes, France). Deux modes opératoires d'élution sont possibles avec un système biphasique : un mode descendant quand la phase mobile est la plus lourde et en mode descendant dans le cas opposé. Pour l'extraction, le solvant (phase organique) est gardée stationnaire quand la phase aqueuse est pompée au travers en mode descendant.

Figure II. 18. Extracteur de partage centrifuge utilisé dans cette étude

Dans ce travail le potentiel de l'EPC appliqué à l'extraction des composés phénoliques a été examiné. Pour cela, 1 Litre d'un mélange acétate d'éthyle : eau distillée (50 :50 v/v) a été préparé : deux phases sont obtenues : une phase aqueuse saturée en AE et une phase organique saturée en eau. Tout d'abord, une suspension algale est préparée comme suit : 10 g de poudre d'algue lyophilisée sont mélangés à 150 mL de phase aqueuse; la suspension obtenue est homogénéisée à l'aide d'ultrasons pendant 15 min. La phase organique est utilisée comme phase stationnaire pendant que la suspension algale est pompée en tant que phase mobile. L'extraction est effectuée à température ambiante en utilisant un mode descendant à 800 rpm, pendant 3 min, avec un débit de 75 $mL.min^{-1}$. Les conditions opératoires sont choisies d'après les études préliminaires et suivant différentes recommandations :

(1) le solvant d'extraction doit rester stationnaire et la phase aqueuse doit être pompée au travers;

(2) la force centrifuge ne doit pas être trop importante ;

et (3) la rétention du solvant dans la colonne doit être assez efficace (> 50% du volume de la colonne).

En suivant ces recommandations, quatre phases de 30 mL sont récupérées en sortie de colonne. Après rinçage de la colonne les résidus ont également été récupérés pour analyse.

NB : Une analyse complémentaire a été réalisée en utilisant le même appareillage mais cette fois dans le but d'effectuer, en une seule ou deux étapes, une semi-purification des extraits phénoliques à partir de l'algue *S. muticum*. Le protocole utilisé ainsi que les résultats et conclusion de cette étude sont présentés en Annexe n°1.

b) Récupération des différentes phases

Comme mentionné au paragraphe II.3.1.1.c), le sens de rotation du rotor et donc de pompage de la phase mobile peut être inversé à tout moment de l'expérience. En effet, dans cette expérience, après une période d'élution classique (en mode descendant), le sens de rotation est inversé et avec lui la nature de la phase mobile. La phase liquide initialement utilisée comme phase stationnaire (ici le solvant d'extraction des composés recherchés : l'acétate d'éthyle) devient alors la phase mobile, la phase mobile (ici la phase aqueuse) devenant stationnaire, ce qui permet d'éluer en sens inverse les composés d'intérêt (contenus dans l'AE) en un temps réduit. Afin de mieux comprendre comment sont récupérées les fractions en fin de procédé, les étapes d'une extraction de partage centrifuge sont présentées en figure II.19 :

1- Dans un premier temps les cellules du système sont remplies avec la phase la moins dense qui servira de phase stationnaire en mode d'élution descendant (ici notre solvant d'extraction : l'acétate d'éthyle).

2- Afin de placer le système dans un état d'équilibre, et d'obtenir un mélange 50:50 Acétate d'éthyle:eau dans le système, de l'eau saturée en AE est ajoutée au système toujours en mode descendant.

3- Une fois le système à l'équilibre, l'eau est remplacée par la suspension algale considérée comme phase mobile en mode descendant. Durant l'élution, les composés ayant plus d'affinité pour la phase apolaire (AE) vont passer dans la phase stationnaire alors que les composés plus polaires vont passer dans la phase aqueuse. La phase AE va alors se colorer en vert (pigments) et la phase aqueuse va se décolorer.

4- Après un temps de séjour d'environ 3 min, lorsque le front de solvant sort de la colonne, on inverse le mode d'élution pour le passer en mode ascendant, la phase la plus dense, ici l'acétate d'éthyle, devient alors la phase mobile. Celle-ci est donc entraînée vers la sortie du système, on récupère alors les fractions chargées en composés. Dans l'exemple présenté en figure II.19, on récupère 4 fractions de 30 mL chacune.

Enfin, après avoir récupéré les différentes phases, le contenu des cellules non récupéré est « poussé » hors du système lors du rinçage, on récupère ainsi ce qu'on appellera les « résidus machine» (notés « RésM » sur les graphiques).

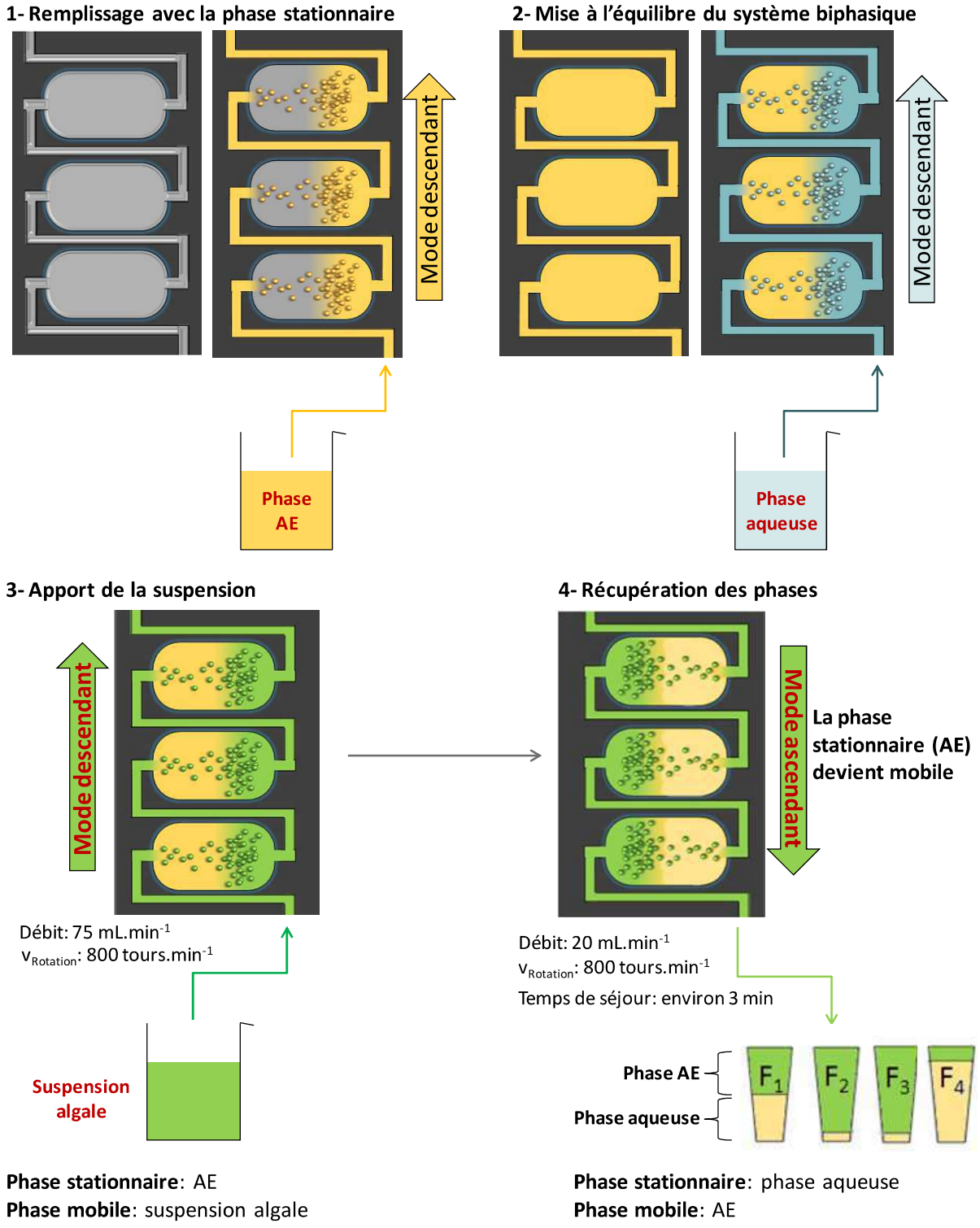


Figure II. 19. Etapes du procédé d'extraction de partage centrifuge et récupération des différentes phases en fin de procédé lors d'une extraction de partage centrifuge.

c) Analyses effectuées

Cette étude a été mise en place sur les deux espèces d'algues brunes *Sargassum muticum* et *Ascophyllum nodosum* récoltées au Dellec (*cf.* chapitre I) au mois de Janvier 2010. Les protocoles utilisés afin d'effectuer les dosages (teneur en composés phénoliques, activités antiradicalaire et antioxydante) sont décrits plus haut (*cf.* chapitre I). En parallèle, les différents extraits ont été analysés en RMN du proton au service RMN de l'UBO après lyophilisation et remise en suspension de l'extrait dans du Méthanol Deutéré avant analyse RMN.

II.3.2.2. Extraction par fluide pressurisé et fluide supercritique

Cette partie du travail a pu se faire grâce à une collaboration avec Pr. Elena Ibanez de l'Université de Madrid en Espagne dans le cadre du projet GIS Europôle Mer Phlorotan'ING.

a) Extraction par fluide supercritique (Supercritical Fluid Extraction, SFE)

Un extracteur à fluide supercritique de type Suprex PrepMaster (Suprex, Pittsburgh, PA) a été utilisé pour l'extraction aux fluides supercritiques. Cet extracteur est équipé d'une pompe à double piston pour le CO_2. Pour ces expériences, 2.5 g d'algue sont mélangés avec 2.5 g de sable de mer (utilisé en tant qu'agent dispersant, pour éviter le colmatage du système) et la suspension est placée dans une cellule d'extraction en acier inoxydable de 20mL. La cellule d'extraction est équipée, à ses deux extrémités, de filtres en coton de verre pour éviter une filtration des échantillons en fin de procédé. L'éthanol étant utilisé comme co-solvant, celui-ci est pompé en utilisant une pompe HPLC Jasco PU2080 (Jasco Inc., Easton, PA) pour être ensuite mélangé à haute pression avec le CO_2 dans son état supercritique (SC-CO_2). La suspension sous pression passe par un échangeur chaud avant d'entrer dans la cellule d'extraction. Le débit est contrôlé par une valve à pointeau à pression variable. Toutes les extractions son effectuées en utilisant du CO_2 modifié avec 12% d'éthanol (v/v) à 15.2 MPa (environ 2204 psi) et à 60°C durant 90 minutes. Les extraits sont ensuite collectés dans des flacons en verre puis conservés dans la glace. Les échantillons sont ensuite aliquotés et lyophilisés avant toute utilisation.

b) Extraction par fluide pressurisé (Pressurized liquid extraction, PLE)

Les différentes expériences d'extraction à liquide pressurisé (PLE) ont été mises en place en utilisant un extracteur à solvant accéléré (ASE 200, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) équipé d'un contrôleur permettant de garder les solvants à la concentration désirée. Dans tous les cas, 2.5 g d'algue lyophilisée sont placés dans une cellule d'extraction de 11 mL équipée à ses deux extrémités de filtres en cellulose. Deux solutions hydro-éthanoliques différentes ont été testées en tant que solvant d'extraction : une solution à 75% ou à 25% d'éthanol (v/v) dans de l'eau distillée. Dans un premier temps, la cellule d'extraction est remplie avec le solvant choisi et la pression est augmentée jusqu'à la valeur désirée. Le temps nécessaire au chauffage au début de l'expérience dépend de la température d'extraction ; il a été fixé à 6min étant donné la température d'extraction de 120°C. Un procédé d'extraction statique est utilisé ici, toutes les

valves restent donc fermées durant le temps d'extraction choisi, ici 20 min. Durant l'extraction, la pression est maintenue à 10.3 MPa (environ 1500 psi). Après l'extraction, la cellule d'extraction et la tubulure sont rincées avec le solvant d'extraction (avec 60% du volume de la cellule). Enfin, tout le système est purgé afin d'éliminer toute trace de solvant avec de l'azote gazeux. Les extraits sont récupérés dans des flacons. Le système d'extraction est rincé succinctement entre chaque extraction pour éviter toute contamination d'un échantillon à l'autre. Les paramètres utilisés ici pour l'extraction ont été choisis en accord avec de précédentes études (Borras Linares *et al.,* 2011 ; Borges *et al.*, 2012) qui définissaient les combinaisons température/durée d'extraction/pression les plus efficaces. De hautes températures sont généralement plus efficaces (Santoyo *et al*., 2009 ; Plaza *et al*., 2010 ; Borras Linares *et al.,* 2011) mais, comme pour la SFE, des températures comprises entre 100 et 150°C sont privilégiées. La durée d'extraction de 20 min reste inchangée par rapport à des études précédentes effectuées sur ce même système et sous des conditions d'extraction similaires (Santoyo *et al.*, 2009 ; Plaza *et al.*, 2010). La pression de travail étant fonction de la température, elle a été fixée à 10MPa en accord avec la température choisie. L'utilisation de solutions hydro-éthanoliques comme solvant d'extraction a déjà montré son efficacité lors de précédentes études pour l'extraction de molécules actives (Santoyo *et al.*, 2009 ; Borras Linares *et al.,* 2011). Ne connaissant pas réellement la polarité des composés à extraire chez les algues brunes étudiées, deux mélanges ont été testés : 25 et 75% d'éthanol (v/v) dans de l'eau distillée.

c) Analyses effectuées

Les deux techniques alternatives faisant intervenir des solvants à haute pression ou dans leur état supercritique : l'extraction par fluide supercritique (SFE) et par fluide pressurisé (PLE) ont été testées sur les sur les trois espèces de macroalgues brunes *Sargassum muticum*, *Ascophyllum nodosum* et *Pylaiella littoralis* récoltées au Dellec au mois de Janvier 2010 (*cf.* chapitre I). Les trois modèles utilisés permettent de juger si ces procédés peuvent être appliqués à n'importe quel modèle d'algue brune.

Les teneurs en composés phénoliques sont déterminées sur les extraits par la méthode de Folin-Ciocalteu et leurs activités antiradicalaire et antioxydante sont mesurées par les dosages colorimétriques décrits plus haut (*cf.* chapitre I). En parallèle, les différents extraits sont analysés en RMN du proton au service RMN de l'UBO après lyophilisation et remise en suspension dans du Méthanol Deutéré. Toutes les manipulations sont effectuées en triplicat pour l'analyse statistique des résultats.

II.3.3. Résultats

II.3.3.1. Extraction de Partage Centrifuge (EPC)

Lors de cette étude préliminaire, les composés phénoliques extraits par CPC pour les deux espèces *S. muticum* et *A. nodosum* et leurs activités antiradicalaires et antioxydantes associées, se répartissent de façon similaire entre les phases 1 à 4, et différemment dans le résidu (Figure II.20).

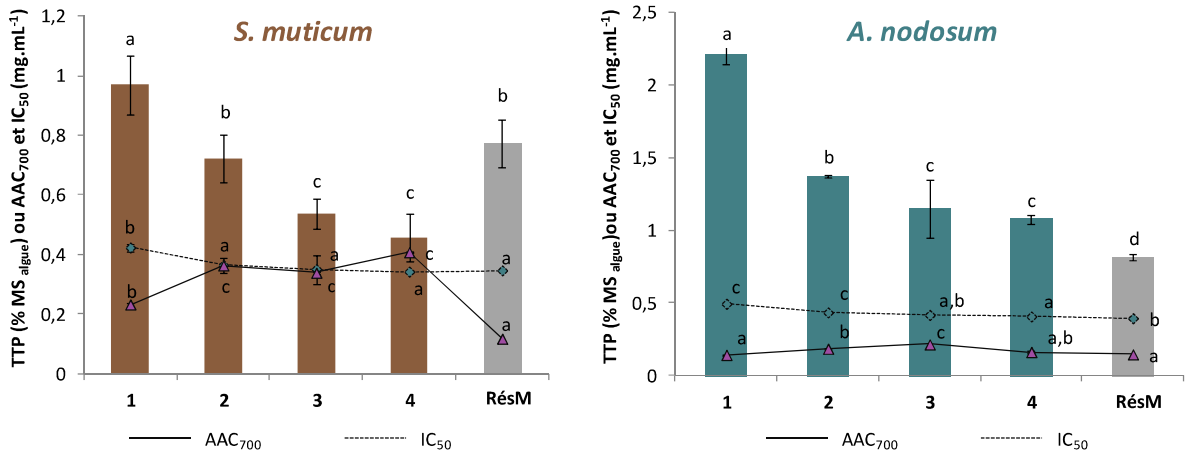


Figure II. 20. Teneurs en composés phénoliques chez *Sargassum muticum* et *Ascophyllum nodosum* dans les différentes fractions obtenues en sortie de colonne EPC (% de MS ; moyenne +/- écart type). Les groupes correspondent aux résultats de l'analyse statistique (ANOVA, p< 0.05 ; Tukey). Les courbes représentent les activités antiradicalaire et antioxydante associées (mg.mL^{-1} +/- écart type). Les lettres correspondent aux résultats du test *a posteriori* (ANOVA, p< 0.05 ; Tukey).

Quelle que soit l'espèce considérée, la quantité de CP diminue en fonction de l'avancement de l'expérience. Ainsi on passe de 0.97 ± 0.10 à 0.45 ± 0.08 %MS pour *S. muticum* de la première à la dernière fraction et de 2.21 ± 0.06 à 1.08 ± 0.03 %MS pour *A. nodosum* de la première à la dernière fraction. Pour *S. muticum* on remarque que les 'résidus machine' contiennent beaucoup de CP par rapport à ceux déjà extraits dans les différentes fractions : 2.69% au total dans les fractions contre 0.77% dans les résidus, ce qui représente plus de 29% des CP extrait restant dans les résidus. Alors que pour *A. nodosum* les résidus sont un peu moins chargés en CP par rapport à ceux déjà extraits (les résidus représentent moins de 14% de la totalité des CP extraits). En ce qui concerne les activités des différentes fractions, on remarque que celles-ci vont avoir tendance à augmenter légèrement au cours de l'expérience. Ainsi on passe de 0.42 ± 0.02 à 0.34 ± 0.01 mg.mL^{-1} pour l'IC_{50} chez *S. muticum* entre la fraction 1 et la 4 et de 0.49 ± 0.04 à 0.41 ± 0.03 mg.mL^{-1} chez *A. nodosum* (Figure II.20). Cette tendance n'est pas observée pour l'activité antioxydante qui a plutôt tendance à diminuer avec la progression de l'expérience. Ainsi l'AAC_{700} varie de 0.23 ± 0.01 à 0.41 ± 0.01 mg.mL^{-1} chez *S. muticum* entre la fraction 1 et la 4 et de 0.14 ± 0.01 à 0.16 ± 0.01 mg.mL^{-1} chez *A. nodosum*. Enfin, quelle que

soit l'espèce considérée, les activités sont très importantes dans les résidus (0.35 ± 0.04 et 0.39 ± 0.01mg.mL^{-1} pour l'IC_{50} ; et 0.12 ± 0.01 et 0.15 ± 0.01 mg.mL^{-1} pour l'AAC_{700} pour *S. muticum* et *A. nodosum*, respectivement). La RMN du proton permet ici de confirmer la présence de CP dans les différentes fractions (Figure II.21). Les tendances mises en évidence par le test colorimétrique de Folin-Ciocalteu sont retrouvées ici. En effet, on a bien une diminution de la quantité de CP au cours de l'expérience et il y a bien des CP résiduels dans la fraction récupérée après rinçage de l'appareil (Figure II.21). Seul le spectre correspondant aux fractions obtenues pour *A. nodosum* est présenté ici : la quantité de CPs présent chez *S. muticum* ne permettant pas de visualiser correctement l'évolution de la quantité de CP au cours de l'expérience.

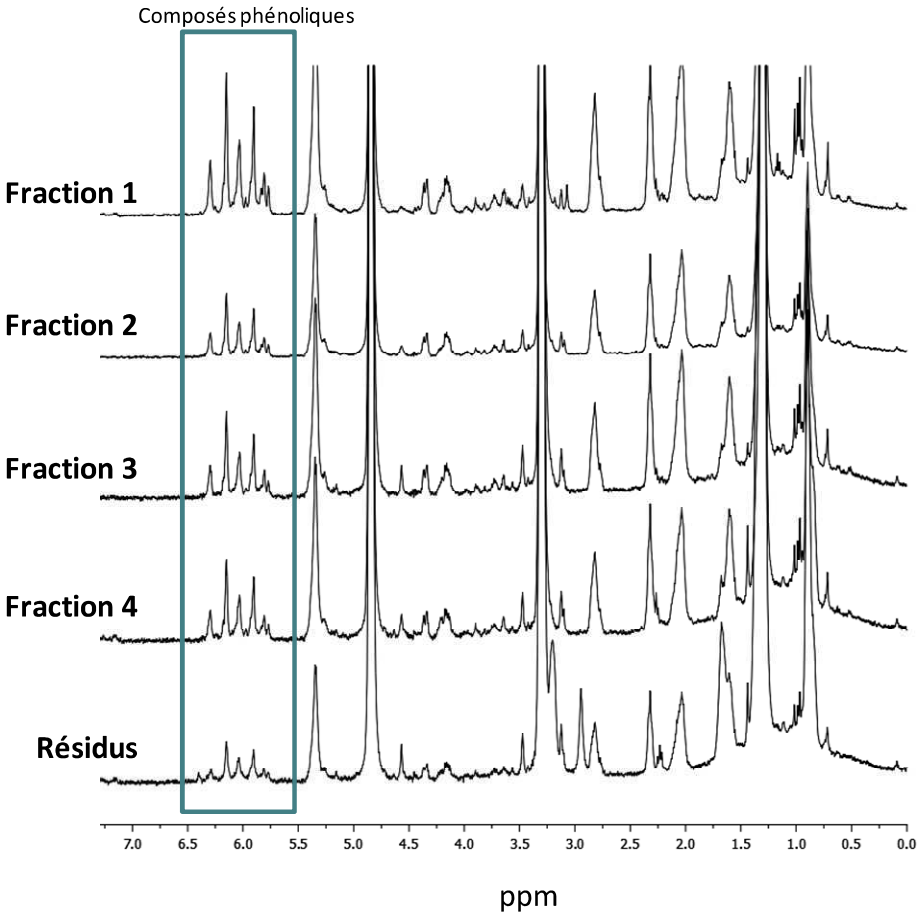


Figure II. 21. Spectres ^{1}H RMN des différentes fractions obtenues en sortie de colonne suite à l'analyse CPC d'un extrait phénolique à partir de l'algue brune *A. nodosum.* Chaque phase a été reprise dans du solvant MeOD.

II.3.3.2. Extraction par fluide pressurisé et fluide supercritique

La Figure II.22 présente les teneurs en CP d'extraits, et leurs activités antiradicalaire et antioxydante associées, obtenus à partir des deux procédés SFE et PLE pour les trois espèces de macroalgues brunes étudiées.

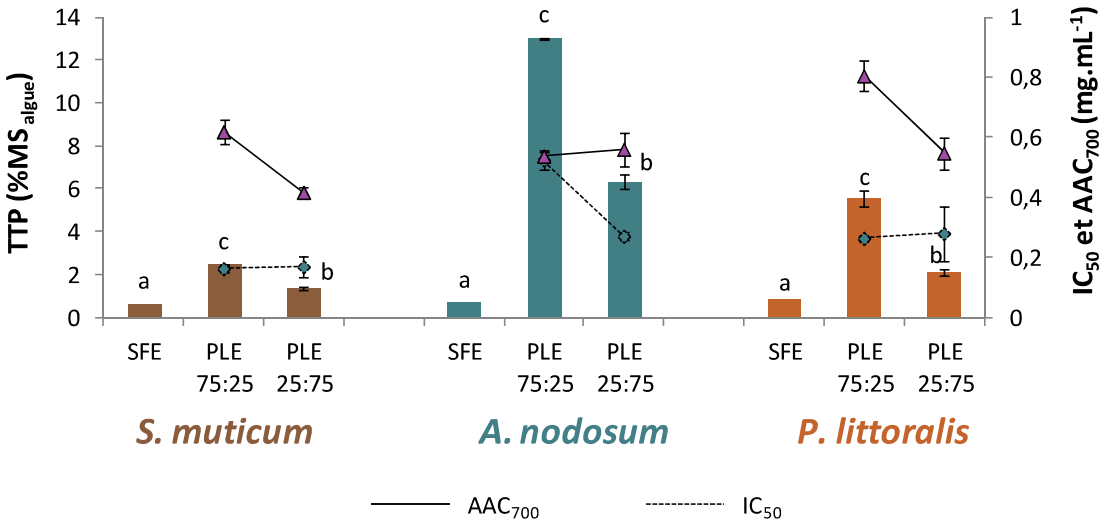


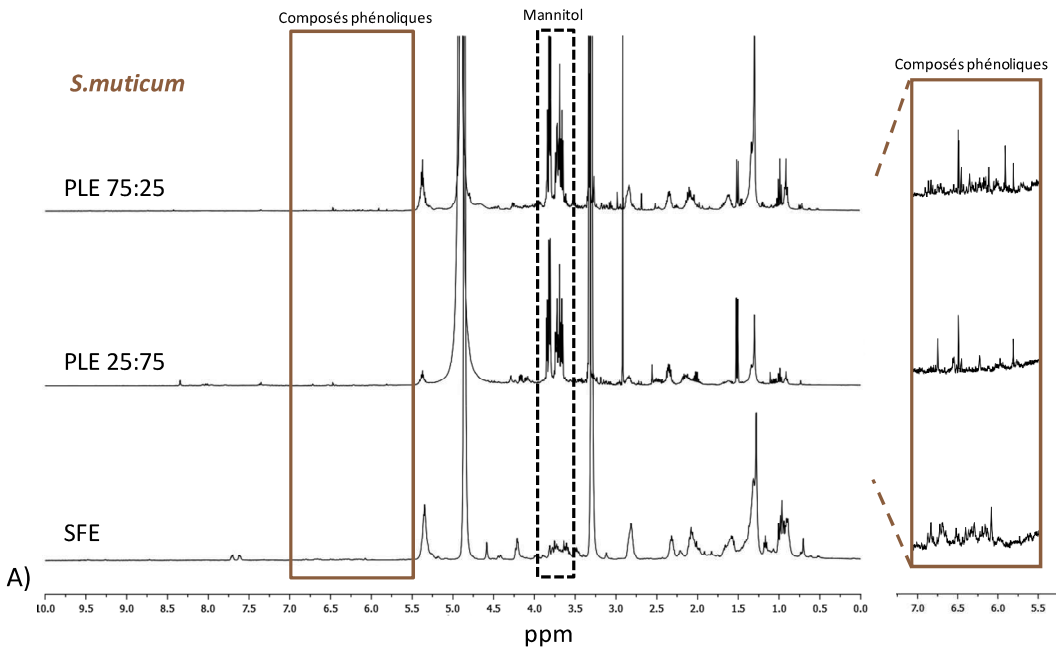
Figure II. 22. Teneur en composés phénoliques (%MS algue) et activités antiradicalaires (IC_{50}, tirets) et antioxydantes (AAC_{700}, trait plein) associées, exprimées en $mg.mL^{-1}$ par espèce de macroalgue brune (*Sargassum muticum, Ascophyllum nodosum, Pylaeilla littoralis*) et en fonction des différentes techniques utilisées Supercritical Fluid Extraction : SFE ; Pressurized Liquid Extraction : PLE avec 75% ou 25% d'éthanol. Les lettres correspondent aux résultats du test *a posteriori* (ANOVA, p< 0.05 ; Tukey).

Les différent procédés d'extraction ont un effet significatif sur la teneur en CP chez les trois espèces considérées (ANOVA, p<0.001, Figure II.22). Toutes espèces confondues, la PLE utilisant un mélange éthanolique à 75% (v/v) est le procédé le plus efficace pour l'extraction des CPs (2.46 ± 0.03 %DW, 13.01 ± 0.04 %DW et 5.53 ± 0.04 %DW pour *S. muticum*, *A. nodosum* et *P. littoralis*, respectivement). Le procédé le moins efficace est l'extraction utilisant le CO_2 supercritique (SFE). Dans tous les cas, il permet d'extraire moins de 1% de CP par rapport à la matière sèche de l'algue (0.62 ± 0.01 %DW, 0.67 ± 0.01 %DW et 0.84 ± 0.02 %DW pour *S.muticum*, *A.nodosum* et *P.littoralis*, respectivement). L'utilisation d'un mélange à 25% en PLE permet d'extraire un peu moins de la moitié des composés phénoliques par rapport à la PLE 75%.

L'activité antiradicalaire des extraits (IC_{50}) est la plus importante pour les extraits provenant de l'extraction PLE 75% pour *S. muticum* et *P. littoralis* (0.16 ± 0.01 et 0.26 ± 0.01 $mg.mL^{-1}$ avec p<0.001, pour *S. muticum* et *P. littoralis*, respectivement, Figure II.22). En revanche, pour *A. nodosum* c'est l'extraction utilisant 25% d'éthanol qui permet d'obtenir la plus grande activité antiradicalaire (0.27 ± 0.03 contre 0.52 ± 0.01 $mg.mL^{-1}$ à p<0.001 pour la PLE 25% et 75% respectivement). Les extraits provenant de la SFE ne sont pas actifs. En effet, l'IC_{50} est supérieur à 20 $mg.mL^{-1}$ pour chacune des espèces utilisées (résultats non présentés).

L'activité antioxydante (AAC_{700}) des extraits la plus importante est mesurée sur les extraits provenant de la PLE 25% pour *S. muticum* et *P. littoralis* (0.42 ± 0.01 et 0.55 ± 0.05 $mg.mL^{-1}$ à $p<0.001$, pour *S. muticum* et *P. littoralis*, respectivement). En revanche, comme pour l'IC_{50}, c'est l'extraction utilisant 25% d'éthanol qui permet d'obtenir chez *A. nodosum* la plus grande activité antioxydante (0.54 ± 0.01 contre 0.56 ± 0.05 $mg.mL^{-1}$ à $p<0.001$ pour la PLE 25% et 75% respectivement). Les extraits provenant de la SFE, ici aussi, ne sont pas actifs : en effet leur AAC_{700} dépasse les 20 $mg.mL^{-1}$ pour chacune des espèces utilisées (résultats non présentés).

Suite à l'analyse RMN du proton des différents extraits obtenus, la présence de CP (entre 5.5 et 6.5 ppm) et la présence de mannitol en grande quantité (entre 3.6 et 3.9 ppm) est observée sur un grand nombre des spectres obtenus (Figure II.23). Un large pic de mannitol est en effet visible quelles que soient les espèces, mis à part les spectres provenant des extraits obtenus à partir de l'extraction au CO_2 supercritique. On remarque également la présence de signaux dans la zone des aromatiques sauf pour *A. nodosum* avec la technique SFE (Figure II.23B). Cette technique ne permet pas, en effet, d'obtenir une quantité suffisante de CP pour cette espèce (seulement 0.7% MS au lieu de 13%MS avec la PLE 75% par exemple). D'autre part, on remarque, et ceci pour les trois espèces, que la forme des signaux est très différente d'une technique à l'autre. Il s'agirait donc de composés de natures différentes, dû certainement à la polarité différente des solvants utilisés. Par exemple, pour *A. nodosum*, on observe un pic unique (singulet) vers 6.45 ppm avec l'utilisation de la PLE 25% alors qu'on observe une multitude de pics entre 5.5 et 6.5 ppm avec la PLE 75% (Figure II.23B). Pour *S. muticum* et *P. littoralis,* peu de différences sont observées entre les spectres obtenus avec la technique PLE utilisant 25 ou 75% d'éthanol, seule l'intensité des pics est moins importante avec la PLE 25% (Figure II.23 A et C).



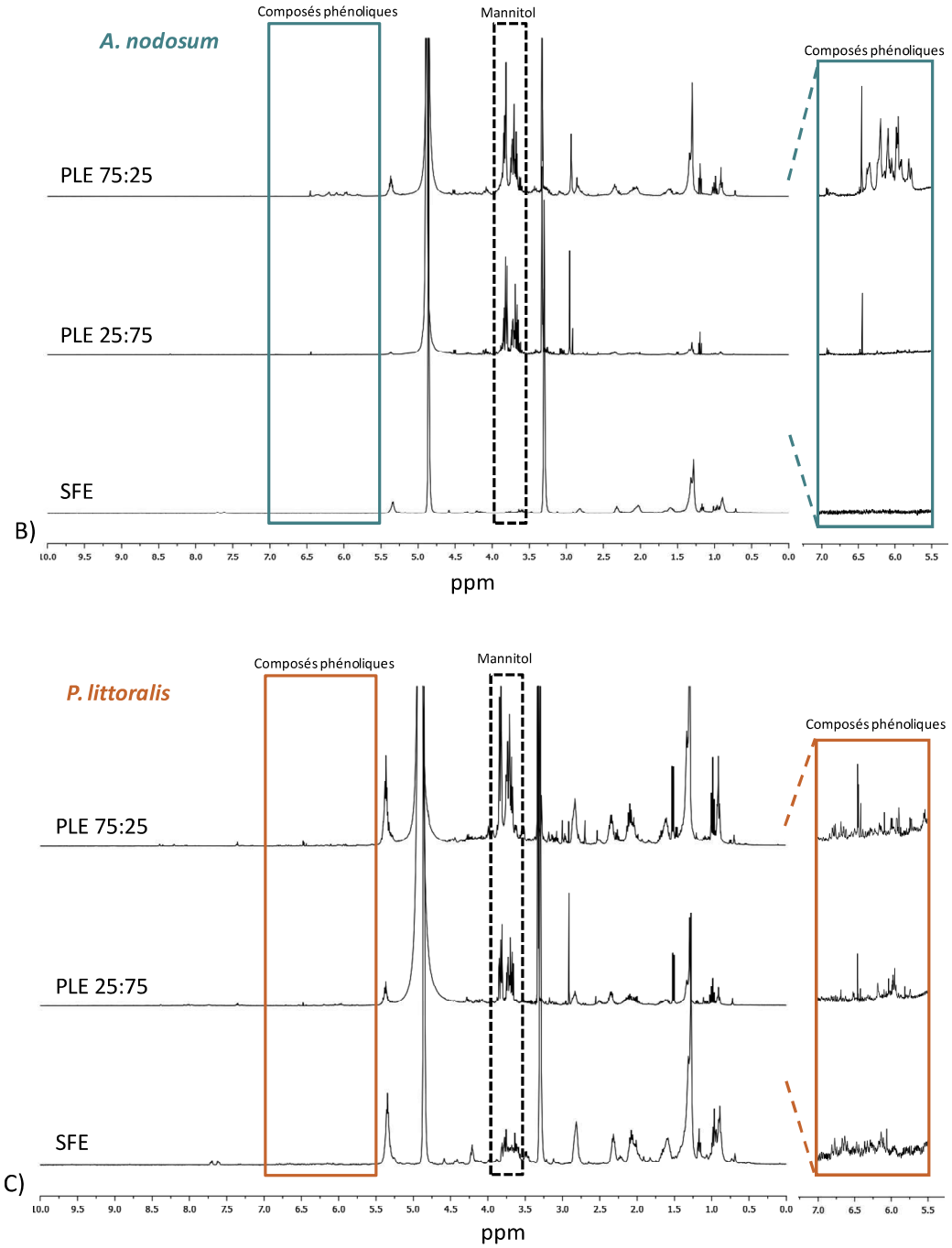


Figure II.23. Spectres ^{1}H RMN des extraits obtenus par différents procédés appliqués à l'extraction de composés phénoliques chez trois espèces de macroalgues brunes. A) *Sargassum muticum*, B) *Ascophyllum nodosum*, C) *Pylaeilla littoralis*. De bas en haut : SFE, PLE éthanol : eau 25 :75 (v/v) et 75 :25 (v/v)) dans du solvant MeOD. A droite : zoom sur la fenêtre 5.5 à 7 ppm.

II.3.3.3. Comparaison des procédés innovants (SFE, PLE, EPC) avec l'extraction S/L classique

L'intérêt des procédés « verts » par rapport à l'extraction solide-liquide classiquement utilisée au laboratoire pour l'extraction de composés phénoliques actifs chez l'algue brune *Sargassum muticum* a fait l'objet d'une publication dans la revue «*Talanta* » sous la référence suivante :

"Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model"

Tanniou Anaëlle, Serrano León Esteban, Vandanjon Laurent, Ibanez Elena, Mendiola Jose A., Cérantola Stéphane, Kervarec Nelly, La Barre Stéphane, Marchal Luc , Stiger-Pouvreau Valérie.

Talanta 104, 44-52

En résumé, une étude comparative entre les procédés d'extraction « nouvelle génération » comme l'extraction de partage centrifuge (EPC), l'extraction par fluide supercritique (EFS) et l'extraction par liquide pressurisé (ELP) et l'extraction solide-liquide classiquement utilisée au laboratoire ou industriellement a été menée. Il s'agissait de mesurer l'efficacité (sélectivité et productivité) du procédé dans le but d'obtenir des fractions de composés phénoliques actives chez l'algue modèle *Sargassum muticum*. Le choix du procédé le plus efficace fut basé sur plusieurs mesures : la teneur totale en phlorotannins (TTP), les activités anti radicalaires et antioxydantes associées et également la productivité de la méthode employée. Quel que soit le solvant utilisé par le procédé, les méthodes d'extraction « modernes » sont toujours plus efficaces que la méthode classique. A l'exception de l'EFS qui ne permet pas d'extraire la totalité du pool de composés phénoliques présents chez la Sargasse. En revanche deux des procédés testés sont particulièrement prometteurs. Tout d'abord, l'EPC permet d'obtenir les meilleurs rendements lors de l'extraction des CPs et ainsi de récupérer des fractions concentrées en CP (22.90 ± 0.65 $\%MS_{fraction}$) et actives (0.52 ± 0.02 et 0.58 ± 0.19 $mg.mL^{-1}$ pour l'IC_{50} et l'AAC_{700}, respectivement). Ensuite, l'ELP utilisant un mélange éthanol:eau 75:25 (v/v) permet une bonne extraction des CP (10.18 ± 0.25 $\%MS_{fraction}$) avec une haute efficacité. Malgré l'obtention d'extraits moins actifs (0.77 ± 0.01 et 1.59 ± 0.15 $mg.mL^{-1}$ pour l'IC_{50} et l'AAC_{700}, respectivement) l'ELP est un procédé respectueux de l'environnement, et répond aux normes européennes pour l'utilisation et la valorisation des composés phénoliques de la sargasse.

Talanta 104 (2013) 44–52

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model

Tanniou Anaëlle [a,*], Esteban Serrano Leon [a], Vandanjon Laurent [b,f], Ibanez Elena [c], Jose A. Mendiola [c], Cerantola Stéphane [d], Kervarec Nelly [d], La Barre Stéphane [e], Marchal Luc [c], Stiger-Pouvreau Valérie [a]

[a] LEMAR UMR CNRS UBO IRD IFREMER 6539, Université de Bretagne Occidentale (UBO), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), Technopôle Brest-Iroise, Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France
[b] GEPEA UMR CNRS 6144, Université de Nantes, Laboratoire GEPEA, CRTT, 44602 Saint-Nazaire, France
[c] Bioactivity and Food Analysis Department, Institute of Food Science Research, CIAL (CSIC-UAM), Nicolás Cabrera 9, Campus UAM Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain
[d] Service RMN-RPE, UFR Sciences et Techniques, Université de Bretagne Occidentale (UBO), Avenue Le Gorgeu, 29200 Brest, France
[e] Végétaux marins et Biomolécules, UMR 7139 CNRS UPMC, Station Biologique, F-29682 Roscoff, France
[f] LIMATB, Université de Bretagne Sud, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 July 2012
Received in revised form
26 October 2012
Accepted 29 October 2012
Available online 9 November 2012

Keywords:
Antioxidant activities
CPE
Marine biotechnology
Phenolic compounds
PLE
SFE
Solid/liquid extraction
Sargassum muticum

ABSTRACT

A comparative study between "alternative" extraction processes such as centrifugal partition extraction (CPE), supercritical fluid extraction (SFE) and pressurized liquid extraction (PLE) and classical solid/liquid used in the laboratory are currently focusing on the efficiency (selectivity and productivity) to obtain bioactive phenolic compounds from the phaeophyte *Sargassum muticum* model. The choice of the best process was based on several measurements: (i) the total phenolic content measured by the colorimetric Folin–Ciocalteu assay, (ii) radical scavenger and antioxidant activities assessed by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay, and the β-carotene bleaching method and finally (iii) the method productivity. Irrespective of the solvent used in the processes, alternative methods are always sharply more effective than classical ones. With the exception of SFE which does not allow extracting the totality of the active phenolic compounds, two of the other extraction methods were particularly promising. First, CPE afforded the most important yields in concentrated phenolic compounds (PC) (22.90 + 0.65%DW) also displaying the best activities (0.52 + 0.02 and 0.58 + 0.19 mg/mL for IC50 and AAC_{700}, respectively). Secondly, PLE using an EtOH:water mixture 75:25 (v/v) allowed a good PC extraction (10.18 + 0.25%DW) with huge efficiency. Despite a lesser activity of the extracts (0.77 + 0.01 and 1.59 + 0.15 mg/mL for IC50 and AAC_{700}, respectively) PLE is a green process and potentially complies European norms requirements for the prospective valorization of phenolic compounds from *S. muticum* in Brittany.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Phenolic compounds (PC) in brown algae, also called phlorotannins are secondary defense metabolites synthesized during development as components of algal cell-walls [1] or as chemical defense in response to abiotic and biotic stress conditions, such as UV radiation, grazing, bacterial infection and epiphytism, as well as in intra- and inter-specific communication [2–5]. As these compounds are produced in response to the production of reactive oxygen species (ROS), PC exhibits antiROS, i.e. antioxidative properties [6–8]. Structurally, phlorotannins are oligomers and polymers of 1,3,5-trihydroxybenzene (phloroglucinol) [2] can be considered as a pool composed by CP of different natures and/or polarities. In the last few years, natural antioxidants from plant and animal sources are actively investigated as replacements for synthetic antioxidants currently used as food additives. Conventional solvent solid/liquid extraction is frequently used to extract bioactive compounds from algae [9–16]. Nevertheless, this time-consuming technique often uses large volumes of toxic organic solvents. Advanced alternative processes exist and are already used for the extraction of various biomolecules, such as amino acids, fatty acids, natural pigments, polysaccharides, vitamins, toxins and other metabolites from seaweeds [17]. In particular, supercritical-fluid extraction (SFE), pressurized-liquid extraction (PLE) and centrifugal partition extraction (PCE) are frequently used for these classes of compounds [17–27].

Abbreviations: CPE, centrifugal partition extraction; PC, phenolic compounds; PLE, pressurized liquid extraction; ROS, reactive oxygen species; SFE, supercritical fluid extraction; TPC, total phenolic content

* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 49 86 68; fax: +33 2 98 49 87 72.
E-mail addresses: anaelle.tanniou@live.fr, anaelle.tanniou@univ-brest.fr (T. Anaëlle).

0039-9140/$ - see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.088

In our ongoing investigations to quantitatively optimize and qualitatively refine phlorotannins extraction from brown algal tissues, we present here a comparative study of the alternative methods mentioned hereafter versus the classical solvent-extraction method still used in many laboratories. CPE has been widely used for the extraction of natural products [26,28–30]. This technique is very attractive in terms of selectivity, amenable to sample loading capacity and scaling-up ability [31–33]. SFE operates at low temperatures in oxygen-free conditions and uses supercritical CO_2 as the extractive agent. These characteristics make SFE an ideal technique for the extraction of natural antioxidants. On the other hand, PLE can use all kind of solvents at relatively high temperatures and pressures enough to keep them in liquid state; advantages associated to its use are the low solvent volumes employed and the short extraction times, compared to conventional processes. Moreover, high extraction yields have been commonly associated to this technique. Green (meaning that complies with the principles of Green Chemistry; [34]) and selective extraction methods such as SFE and PLE are now preferred to all others.

Sargassum muticum (Yendo) Fensholt was chosen as model organism to carry out these assays. This introduced brown macroalga has widely spread along the French Atlantic coasts and is currently one of the most accessible Sargassaceae species on the French Brittany shores. This large sustainable biomass could represent a viable biotechnological asset in the regional resource development programs. Moreover this species is known to produce interesting phenolic compounds [35] of low molecular weight [15] which can be extracted and purified more easily than bigger polymers and having already demonstrated biological activities such as antifouling and antioxidant ones [10,36,37]. The potential represented by *S. muticum* led us to carry out a study aimed at selecting the best extraction technique, i.e. which would maximize yield while minimizing the denaturation and the loss of original properties, of the polyphenols of interest. More specifically, we need: (i) to control and validate the quantity and the quality of PC extracted by each process (Folin and NMR profiles), (ii) to verify that active extracts are not lost during the process and finally (iii) to monitor the process productivity by taking into account the PC quantity obtained in regard of freeze-dried raw material quantity, solvent quantity and extraction time.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Thalli of *S. muticum* were collected in July 2011 at the Dellec (Plouzané), a semi-exposed field site on the western coast of Brittany (France). This month was chosen because phenolic-rich thalli of *S. muticum* are best collected in summer [4,10].

During collection, only the apical and median parts of the thalli were retained and the holdfast was left in place to allow regrowth and thus minimize collecting impact. Immediately after collection and epiphytes removal, seaweeds were washed first with filtered seawater then with distilled water in order to get rid of residual sediments and salts. The cleaned algal materials were then surface dried with blotting paper towel, chopped into fragments, freeze-dried, powder reduced with a Waring Blender and finally sieved at 250 μm.

2.2. Conventional solid/liquid extraction of phenolic compounds

2 g (dw) of finely ground algal material was placed in 250 mL flasks, and extracted using 150 mL volumes of the following solvent mixtures: hexane–EtOH 88:12 (v/v), ethanol 75% (EtOH–water 75:25) and 25% EtOH–water 25:75 or ethyl acetate 50% (AE 50:50) (v/v in distilled water). The choice of these different solvents was done in accordance to alternative approaches (see below). Each preparation was left under stirring at 40 °C for 3 h in the dark. The mixtures were then centrifugated using an Eppendorf 5810R centrifuge (Eppendorf A.G., Hamburg, Germany) at 4000 g for 10 min at 4 °C. The supernatants were then filtered on cotton wool and concentrated to dryness under reduced pressure at 40 °C using a rotary evaporator (R-3000, Büchi, Flawil, Switzerland). About 10 mL of Milli-Q water was then added to each residue to give the crude extract. All extracts were then freeze-dried prior to further analyses (phenolic content quantification and NMR analyses). All the extracts were prepared in triplicate. In graphics, solid/liquid extraction was noted as "classical" extraction with, respectively, hexane–EtOH 88:12 (v/v), ethanol–water (75:25) and (25:75) or EA–water (50:50).

2.3. Alternative extraction of phenolic compounds

2.3.1. Centrifugal partition extraction (CPE)

A centrifugal partition extractor was used for experiments. The centrifugal partition extractor is a prototype built by Kromaton Technology (Annonay, France) for the GEPEA Laboratory using the laboratory knowledge in CPE hydrodynamics and design. The apparatus contains a rotor of 7 circular partition disks engraved with a total of 231 partition asymmetric twin cells arranged circumferentially and connected together by ducts. The stationary phase was maintained inside the column by a centrifugal acceleration generated by the rotation around a single vertical shaft. The volume of the column is 279 mL. The rotation speed can be adjusted from 200 to 1200 rpm, producing a centrifugal acceleration up to 160 g. The mobile phase was pumped through the stationary phase with a 3 pistons Armen Instrument Preparative Pump (Vannes, France). Two operating modes of elution are possible with a biphasic system: the descending mode, when the mobile phase is the heavy one and the ascending mode in the opposite case. For extraction, the solvent (organic phase) is kept stationary while the aqueous phase is pumped in the descending mode. In this work the potential of the CPE apparatus for the extraction of phenolic compounds was examined. For this, 1 L of a mixture of ethyl acetate (EA):distillated water (50:50) was prepared: 2 phases were obtained, an aqueous one saturated in EA and an organic one saturated in water. At first, an algal suspension was prepared as follows: 2 g of freeze-dried algal powder were put in suspension in 150 mL of aqueous phase; the obtained suspension was ultrasounds homogenized during 15 min. The organic phase was used as the stationary phase while the algal suspension was pumped as the mobile phase. The extraction was performed at room temperature, using the descending mode, at 800 rpm, during 3 min, with a flow rate of 75 mL/min. Operating conditions were chosen according to earlier preliminary assays and following different requirements: (1) the extraction solvent has to be stationary and the aqueous phase must to be pumped in the fault; (2) the centrifugal acceleration should not be too strong (to avoid particles sedimentation in the column) and (3) solvent retention in the column ought to be rather good (> 50% volume of the column). In graphics, CPE extraction was noted as "alternative" extraction with EA–water (50:50) as extracting solvent.

2.3.2. Supercritical fluid extractions (SFE)

A Suprex PrepMaster (Suprex, Pittsburgh, PA) supercritical fluid extractor was used for the SFE experiments; the extractor was equipped with a dual piston pump for CO_2. For the experiments, 2.5 g of algae were mixed with 2.5 g of sea sand (as

dispersing agent, to avoid system clogging) and the mixture was loaded into a 20 mL stainless-steel extraction cell. The extraction cell was fitted with glass wool at the inlet and outlet. Ethanol was pumped using a Jasco PU2080 HPLC pump (Jasco Inc., Easton, PA) and mixed at high pressure with supercritical CO_2 (SC-CO_2). Compressed fluid mixture was fed to the heater prior entering the extraction cell. The flow rate was controlled using a needle valve as variable restrictor. All the extractions were performed using CO_2 modified with 12% ethanol at 15.2 MPa (2204 psi) and 60 °C during 90 min. Extracts were collected in a glass vessel cooled by ice. In graphics, SFE was noted as "alternative" extraction with CO_2–EtOH (88:12) as extraction solvent.

2.3.3. Pressurized liquid extraction (PLE)

Different PLE extraction experiments were performed using an accelerated solvent extractor system (ASE 200, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) equipped with a solvent controller to keep solvent ratios at desired level. In all cases 2.5 g of freeze dried algae were loaded into a 11 mL stainless steel extraction cell fitted with cellulose filter at the inlet and outlet. Two solvent mixtures composed of water and ethanol were used, but with different ratios 75:25 and 25:75. In the first step, the extraction cell was filled with the selected solvent and the pressure was increased to the desired level. Initial heat-up time was then applied depending on the extraction temperature. The heat-up time was automatically fixed by the equipment and corresponded to 6 min for 120 °C. A static extraction process was carried out with all valves shut closed for the specified extraction time (20 min), during this period pressure was kept at 1500 psi (10.3 MPa). After the static stage of extraction, the cell and the tubing were rinsed (with 60% of the cell volume) using the fresh extraction solvent. Then, all the solvent present in the system was purged using N_2 gas. The extract from this stage was collected in a vial and pressure of the unit was released. A thorough rinse of the system was applied between the two successive extractions to avoid any carry-over from one experiment into the next. PLE parameters were chosen according to earlier studies [38,39] which allowed defining temperature, duration, pressure and solvents to be used during extraction. High temperatures are generally more effective [17,38,40] but similar to the SFE process, temperature between 100 and 150 °C was preferred. The extraction duration remained unchange with regard to previous studies carried out on this device in the same context: 20 min was sufficient to extract molecules [17,40]. The chosen pressure was about 10 MPa as for the other studies at the chosen temperature. As for the used solvents, it was demonstrated that ethanolic mixtures were very effective for the obtaining of active extracts [38–40]. As no information existed on the exact PC polarity in *S. muticum*, two mixtures of different polarities were thus tested: 25 and 75%. In graphics, PLE extraction was noted as "alternative" extraction with EtOH 75 or 25% as extraction solvent.

Chemicals for SFE and PLE were obtained as follow: ethanol and washed sea sand (0.25–0.30 mm diameter) were supplied by Panreac Quimica S.A. (Barcelona, Spain). CO_2 (Premier quality) and N_2 (Technical quality) were obtained from Carburos Metálicos (Air Products Group, Madrid, Spain). Deionized water was obtained using a Milli-Q system from Millipore (Molsheim, France).

2.4. Quantity and quality of extracts

2.4.1. Determination of the total phenolic contents and Folin–Ciocalteu assay

The total phenolic content of all extracts was colorimetrically (Labsystems, Multiskan MS, Finland) determined with a microplate adapted Folin–Ciocalteu assay [41], which is known to be less affected by interfering compounds; these last substances, however, are thought to account for less than 5% of the Folin–Ciocalteu-reactive compounds in brown seaweeds [42]. Phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was used as a standard, and concentrations were determined in each extract by freeze-drying three aliquots of 1 mL. Total phenolic contents (TPCs) were expressed as percentages of phenolic compounds per dry weight (DW) in the aliquot.

2.4.2. NMR analysis of extracts

The global structural composition of crude extracts was assessed by means of ^{1}H NMR analyses on a Bruker Avance 400 using standard pulse sequences available in the Bruker software (Bruker, Wissembourg, France). All spectra were recorded in MeOD, at room temperature. Chemical shifts were expressed in parts per million. HR-MAS NMR spectra were acquired on a DRX 500 spectrometer (Bruker BioSpin, Wissembourg, France) equipped with an indirect HR-MAS ^{1}H/^{31}P probe head with gradient *Z* at 25 °C. A typical proton ^{1}H HR-MAS NMR spectrum consisted of 64 scans with pre-saturation of the water peak. The HR-MAS spectrum allows to have an idea of composites initially present in the studied seaweed. NMR profiles unambiguously point out PC within extracts, with peak(s) between 5.5 and 6.5 ppm corresponding to signals visible in HR-MAS NMR (see following paragraph) and not hampered by very large mannitol signals (polyol visible between 3.6 and 3.9 ppm). Indeed, the absence of mannitol will facilitate the phenolic compounds purification after extraction.

2.5. Activity measurements of extracts

2.5.1. DPPH radical scavenging assay

The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay modified according to [10] was used to determine the radical scavenger activities in extracts. Ascorbic acid (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), α-tocopherol (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), butylated hydroxyl-anisole (BHA), butylated hydroxyl-toluene (BHT) (respectively 2(3)-*t*-butyl-4-hydroxyanisole and 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) were used as positive controls. The protocol was microplate adapted for a faster use and to decrease sample preparation time. Briefly, various dilutions of the extracts were prepared in triplicate before addition to 12 µL aliquots of 150 µM of DPPH radical (222 µL). The mixture was stored in the dark for 60 min prior to absorbance measurement at 540 nm. Distilled water was used as a negative control. All samples were assayed in triplicate. Antioxidant activity was expressed as IC50 (the concentration of substrate that causes a 50% loss of the DPPH activity). Furthermore, the lower the IC50, the stronger the antioxidant activity. Extracts with an IC50 higher than 10 mg/mL were considered as non-active extracts.

2.5.2. β-Carotene bleaching method

The antioxidant activity of extracts and controls was measured by the β-carotene bleaching microplate adapted method, modified in accordance with literature [43,44]. 2 mL of a β-carotene solution in chloroform (0.1 mg/mL) were added to round-bottom flasks containing 20 mg of linoleic acid and 200 mg of Tween 40. After evaporation with a rotavapor, oxygenated distilled water (50 mL) was added, and the mixture was shaken to form a liposome solution. This mixture was added to 12 µL of extracts, or positive controls (α-tocopherol, BHA and BHT), or negative controls (distilled water and ethanol). The absorbance of the solution at 450 nm was measured immediately (t=0 min) and after 2 h at 50 °C (t=120 min). All samples were assayed in

triplicate. Antioxidant activity was expressed through the antioxidant activity coefficient (AAC) as follows:

$$AAC = \left[\frac{A_{s(120)} - A_{c(120)}}{A_{c(0)} - A_{c(120)}}\right] \times 1000 \quad (1)$$

where $A_{s(120)}$ is the absorbance of the antioxidant mix at $t=120$ min, $A_{c(120)}$ is the absorbance of the control at $t=120$ min, and $A_{c(0)}$ is the absorbance of the control at $t=0$ min. Since the positive controls, BHA and BHT, had an average AAC of 700, this value was arbitrarily chosen to express the antioxidant activity as AAC_{700} [10]. AAC_{700} was then the concentration of substrate needed to obtain an AAC value of 700. A high AAC_{700} was considered as indicative of a weak antioxidant activity.

2.6. Productivity of each assay

The difficulty here was to be abled to compare all these different processes, not using either the same volume of solvent or the same extraction times. To achieve this, we chose to introduce an additional productivity component that takes into account the proportion of PC quantity extracted per mass of algal lyophilisate, against the extraction time and against the solvent volume/amount used for every process. Productivity was calculated as follows:

$$\text{productivity} = TPC\ ExT^{-1}\ SolQ^{-1} \quad (2)$$

where *TPC* is the total phenolic content in milligram PC per gram of algal DW, *ExT* is the extraction time in minute, and *SolQ* is the solvent quantity in litre. Productivity is then expressed in milligram of PC per gram of dried alga per minute and per liter of solvent.

2.7. Ranking of the processes using a score calculation

A score was attributed to every variable considered: TPC (%DW), IC50 (antiradical activity, DPPH), AAC_{700} (antioxidant activity, β-carotene bleaching test) and productivity according to the results of two-way ANOVAs. The score corresponded to the number of groups generated by the post hoc Tukey HSD test as follows: when 3 groups were highlighted, then the most efficient obtained a score of 3, the second a 2 and, finally, the less efficient obtained a 1. When data was common to two groups its score was the mean of the two values. In case of 4 groups, the score was calculated as follows: 'a', 'b', '(a, b)' and 'c'; then 'a' had a 3, 'b' had 2, '(a, b)' had 2.5 and 'c' had 1. Then, for clarity, the scores were converted to a mark between 0 and 10. Finally, all these scores were averaged and the final mark, attributed to each process (classical versus alternative) gave an indication of the most interesting process by taking into account all parameters.

2.8. Statistics

All analyses were carried out in triplicate, and their results are presented as mean values ± standard deviation (SD), using the Statistica 8 (StatSoft®) software for PC. Homogeneity of variance was tested with the Brown–Forsythe test at the 0.05 risk error. The data which did not satisfy the criteria of normality and homoscedasticity for parametric tests were square root transformed. Afterwards, two way ANOVA was performed on TPC, antiradical activity (IC50, DPPH test), antioxidant activity (AAC_{700}, β-carotene bleaching test) and productivity, using methods (classical or alternative) and solvents as fixed factors. When ANOVA demonstrated significant difference, a post hoc Tukey HSD test was carried out to know which means contributed to the effect.

3. Results

3.1. Distinction between processes using PC contents

The different extraction processes had a significant effect on the TPCs from algal samples ($p<0.001$, Table 1; Fig. 1). The highest TPCs were measured on EA–water extracts (22.90 ± 0.65%DW and 18.59 ± 0.52%DW for the alternative and classical extraction method, respectively); on the other hand, the lowest ones were determined on the alternative extraction method using CO_2–EtOH and the classical method using hexane–EtOH extracts (3.45 ± 0.31%DW and 3.72 + 0.18%DW with $p<0.001$ respectively). The observed differences in TPC between the "alternative" and "classical" processes are lower than 5%DW. Only CPE leads to a better extraction yield than the classical method ($p<0.001$). In this case, with EA as extraction solvent, a three-phase extraction was achieved and only the organic phase was retained for the tests: the aqueous phase did not contain PC and had a very low activity (Tanniou unpublished data).

3.2. Distinction between processes using NMR analysis

The presence of phenolic compounds (between 5.5 and 6.5 ppm) together with mannitol in great quantities (between 3.6 and 3.9 ppm) can be noticed (Fig. 2). Phenolic compounds are

Table 1
Variation in TPC (%DW), IC50 (antiradical activity, DPPH test) and AAC_{700} (antioxidant activity, β-carotene bleaching test) in extracts from *Sargassum muticum* according to the extraction method.

Variable	Statistical test		Fixed factors		
			Method	Solvent	Method × solvent
TPC (%DW)	Two way Anova	*df*	1	3	3
		F	16.16	1423.74	105.98
		p	$p<0.001$	$p<0.001$	$p<0.001$
	Tukey $p<0.05$		C > A	$EA > E_{75} = E_{25} > E_{12}$	
IC50 (mg/mL)	Two way Anova (square root)	*df*	1	3	3
		F	57.18	161.28	14.52
		p	$p<0.001$	$p<0.001$	$p<0.001$
	Tukey $p<0.05$		C > A	$E_{12} > E_{25} = E_{75} = AE$	
AAC_{700} (mg/mL)	Two way Anova	*df*	1	3	3
		F	245.21	446.31	205.50
		p	$p<0.001$	$p<0.001$	$p<0.001$
	Tukey $p<0.05$		C > A	$E_{25} > E_{75} > E_{12} = EA$	

Method: C, Classical; A, Alternative. Solvent: EA, EA–water 50:50; E_{12}, CO_2–EtOH or hexane–EtOH 88:12; E_{75}, EtOH–water 75:25; E_{25}, EtOH–water 25:75.

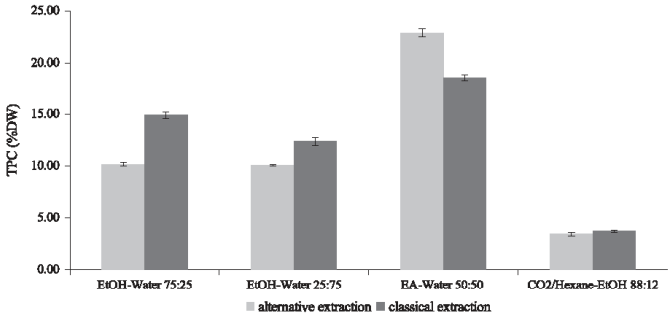


Fig. 1. Total phenolic content (TPC) in extracts from *Sargassum muticum* according to the different extraction methods "alternative": CPE, PLE and SFE using respectively AE–water 50:50, EtOH–water 75:25 or 25:75 and CO_2–EtOH 88:12 (v/v) as extraction solvents or "classical": Solid/Liquid extraction using AE–water 50:50, EtOH–water 75:25 or 25:75 and hexane–EtOH 88:12 (v/v) as extraction solvents.

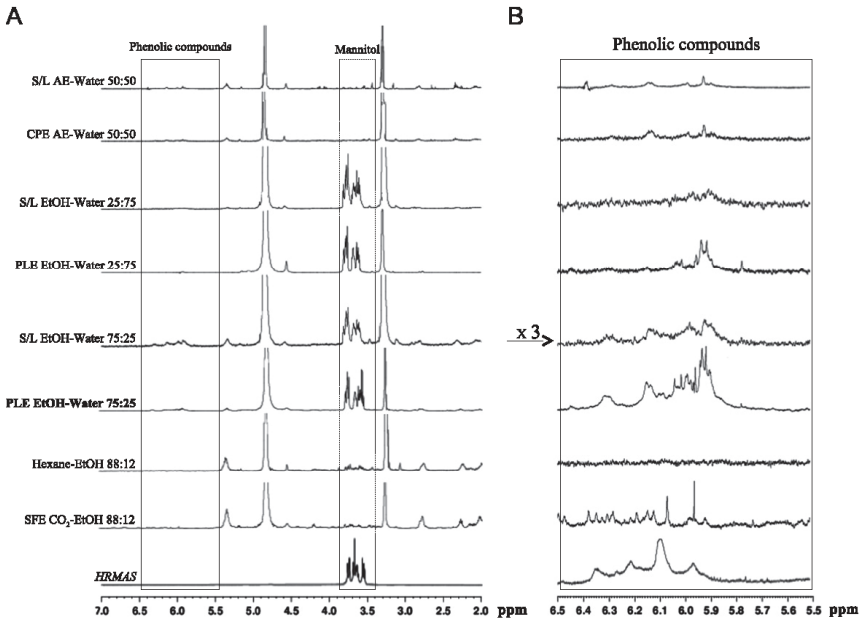


Fig. 2. (A) initial *S. muticum* HR-MAS and ^{1}H NMR extracts profiles in the 2–7 ppm area (B) enlargement (× 3) of the phenolic area between 5.5 and 6.5 ppm. For the EA 50 S/L extraction sample only the organic phase was represented.

present in the extracts, irrespective of the solvents and of the method used except in case of the hexane–EtOH S/L extraction where no phenolic compound was extracted. However phenolic signals are somewhat different between the HR-MAS NMR profiles and vary according to the extraction protocols. Indeed, as the selected processes used different polar solvents, the part of the PC pool extracted during the process will then not be the same according to the process; the idea was previously to be able to get back the majority of compounds composing this pool in a single extraction. For PLE and CPE techniques the PC pools visible on NMR spectra are quite the same between the "alternative" and the "classical" extraction. With CPE two areas of signals are detectable: at about 6.1 ppm and 5.9 ppm for the alternative and classical extraction. With 25% EtOH, for alternative and classical extractions, two areas are also visible: at about 6 and 5.9 ppm. When polarity increases using EtOH 75% as extraction solvent, two other peaks are visible at 6.1 and about 6.3 ppm. For the hexane–EtOH S/L extraction, no aromatic compounds are visible on NMR spectra. Finally, using SFE, phenolic compounds appear very different to those obtained with the other methods: many small signals are visible in the area between 5.9 and 6.4 ppm, showing that different types (differentiated by their polarity) of compounds were extracted in relation with the type of process and/or solvent used. According to NMR spectra, the

technique which allows extracting the great majority of phenolic compounds initially present in *S. muticum* seems to be the PLE EtOH–water 75:25 (v/v).

A large peak corresponding to mannitol can be noticed on the HR-MAS NMR spectra as well as on the ^{1}H NMR spectra obtained on the various extracts, except when EA or hexane–EtOH and CO_2–EtOH mixture were used as extraction solvents.

3.3. Monitoring of activities in extracts between various processes

According to the DPPH test (Table 2), the antioxidant activity (IC50) in the EA extracts (0.52 ± 0.03 and 0.45 ± 0.01 mg mL^{-1} at $p < 0.001$, for the alternative and classical extraction methods, respectively), were significantly higher ($p < 0.001$) than those obtained using other solvents. According to the ANOVA, EA extracts (classical and alternative methods) and EtOH:water 75:25 and 25:75 (classical method) permitted to obtain activities similar to the four positive controls BHA, BHT and Vitamins C and E. On the other hand, the lowest yields were in CO_2–EtOH and hexane–EtOH extracts (28.31 ± 4.20 and 2.60 ± 0.20 with $p < 0.001$ for the alternative and classical extraction methods, respectively) (Tables 1 and 2). The classical S/L method always allowed a better scavenging activity in extracts than with the alternative processes ($p < 0.001$).

The antioxidant activity determined by the β-carotene bleaching method (AAC_{700}) was the highest in hexane–EtOH extracts ($2.46 \times 10^{-4} \pm 5.28 \times 10^{-6}$ mg mL^{-1} with $p < 0.001$ for the classical method) and EA extracts (0.58 ± 0.33 and 0.18 ± 0.01 mg mL^{-1} with $p < 0.001$ for the alternative and classical extraction method, respectively) (Tables 1 and 2). According to the ANOVA, EA extracts (classical and alternative methods) and hexane–EtOH and CO_2–EtOH (classical and alternative method) allowed activities equivalent to positive controls BHA, BHT and Vitamin E.

3.4. Productivity

The productivity varied in relation with the method and solvent ($p < 0.001$ for both factors, Tables 3 and 4). Alternative processes were more efficient than classical ones ($p < 0.001$). The PLE methods allowed obtaining the best productivity (200.13 ± 5.56 and 146 ± 2.40 mg PC g^{-1} DW min^{-1} L^{-1}, for the EtOH–water 75:25 and 25:75, respectively, Table 3) with a greater efficiency for the richest EtOH (75:25) mixture ($p < 0.001$, Tables 3 and 4). CPE productivity was only 2.5% (4.22 ± 0.11 mg PC g^{-1} DW min^{-1} L^{-1}) while other processes came to less than 0.1% that of PLE ($7.35 \times 10^{-3} \pm 5.04 \times 10^{-4}$ to 0.66 ± 0.09 mg PC g^{-1} DW min^{-1} L^{-1}, i.e. the classical hexane–EtOH 88:12 and classical EA extraction, respectively). Thus the alternative methods were unquestionably more effective in term of productivity than the classical methods ($p < 0.001$).

3.5. Ranking of the processes

All the results were combined and assigned by a score as shown in Table 5. Processes using the EA as extraction solvent came first, then processes using EtOH–water mixtures and finally processes using more apolar solvents like hexane–EtOH and

Table 3
Mean productivity according to the extraction method (SD: standard deviation). The best productivities were underlined in the table.

Method	Solvent	Productivity (mg TPC g^{-1} DW min^{-1} L^{-1}) mean values ± SD	Tukey HSD ($p < 0.05$)
Alternative			
PLE	EtOH–water 75:25	200.13 ± 5.56	(a)
PLE	EtOH–water 25:75	146.79 ± 2.40	(b)
CPE	EA–water 50:50	4.22 ± 0.11	(c)
SFE	CO_2–EtOH 88:12	0.74 ± 0.07	(e)
Classical			
S/L	EtOH–water 75:25	1.53 ± 0.06	(d)
S/L	EtOH–water 25:75	1.79 ± 0.10	(d)
S/L	EA–water 50:50	0.66 ± 0.09	(e)
S/L	hexane–EtOH 88:12	< 0.01	(f)

Table 2
Mean values of IC50 (antiradical activity, DPPH test) and AAC_{700} (antioxidant activity, β-carotene bleaching test) measured on extracts from *Sargassum muticum* according to the extraction method (SD: standard deviation). The most active extracts were underlined.

Variable	Method	Solvent	Mean values ± SD	Tukey HSD ($p < 0.05$)
IC50 (mg/mL)	Alternative			
	PLE	EtOH–water 75:25	0.77 ± 0.01	(d,e)
	PLE	EtOH–water 25:75	0.86 ± 0.02	(e)
	CPE	EA–water 50:50	0.52 ± 0.03	(b,c,d)
	SFE	CO_2–EtOH 88:12	non-active	(g)
	Classical			
	S/L	EtOH–Eau 75:25	0.67 ± 0.29	(c,d,e)
	S/L	EtOH–Eau 25:75	0.65 ± 0.03	(c,d,e)
	S/L	EA–Eau 50:50	0.45 ± 0.01	(a,b,c)
	S/L	hexane–EtOH 88:12	2.60 + 0.20	(f)
	Positive controls	BHA	0.27 ± 0.01	(a,b)
		BHT	0.40 ± 0.01	(a,b,c)
		Vit C	0.19 ± 0.01	(a)
		Vit E	0.28 ± 0.02	(a,b)
AAC_{700} (mg/mL)	Alternative			
	PLE	EtOH–water 75:25	1.59 ± 0.27	(d)
	PLE	EtOH–water 25:75	3.50 ± 0.31	(e)
	CPE	EA–water 50:50	0.58 ± 0.33	(b,c)
	SFE	CO_2–EtOH 88:12	0.72 ± 0.22	(c)
	Classical			
	S/L	EtOH–water 75:25	1.61 ± 0.24	(d)
	S/L	EtOH–water 25:75	1.92 ± 0.05	(d)
	S/L	EA–water 50:50	0.18 ± 0.01	(a,b)
	S/L	Hexane–EtOH 88:12	< 0.01	(a)
	Positive controls	BHA	0.22 ± 0.01	(a,b,c)
		BHT	0.22 ± 0.01	(a,b,c)
		Vit E	0.21 ± 0.01	(a,b,c)

Table 4
Variation in the productivity according to the type of solvent and the extraction method.

Variable	Statistical test		Fixed factors		
			Method	Solvent	Method × solvent
Productivity (mg TPC g $^{-1}$ DW min $^{-1}$ L $^{-1}$)	Two way Anova (square root)	*df*	1	3	3
		F	9893.68	3390.59	3294.14
		p	$p<0.001$	$p<0.001$	$p<0.001$
	Fisher LSD A > C		$E_{75} \geq E_{25} \geq EA = E_{100}$		

Method: C, Classical; A, Alternative. Solvent: EA, EA–water 50:50; E_{12}, CO_2–EtOH or hexane–EtOH 88:12; E_{75}, EtOH–water 75:25; E_{25}, EtOH–water 25:75.

Table 5
Classification of processes for the extraction of phenolic compounds in *Sargassum muticum*, using a score calculation in regard of statistical tests carried out on data. The best process was underlined in the table.

Method	Solvent	Phenolic content	Activities		Productivity	Score
			DPPH	β caroten		
Alternative						
PLE	EtOH–water 75:25	3.33	5.00	5.00	10.00	6/10
PLE	EtOH–water 25:75	3.33	2.50	8.75	8.33	6/10
CPE	EA–water 50:50	10.00	8.75	8.75	6.67	9/10
SFE	CO_2–EtOH 88:12	1.67	7.50	2.50	3.33	4/10
Classical						
S/L	EtOH–water 75:25	6.67	5.00	8.75	5.00	6/10
S/L	EtOH–water 25:75	5.00	5.00	8.75	5.00	6/10
S/L	EA–water 50:50	8.33	8.75	10.00	3.33	8/10
S/L	Hexane–EtOH 88:12	1.67	10.00	5.00	1.67	5/10

CO_2–EtOH mixtures, the latter being the least efficient as extracting solvent for phenolic compounds in *S. muticum*.

4. Discussion

This study dealt with the effect of different extraction methods on the TPC and antioxidant activities of *S. muticum* extracts. All extracts obtained by the different classical and alternative processes were made up of over 10% PC except for those obtained using CO_2–EtOH and hexane–EtOH mixtures as extracting solvents, thereby demonstrating that both the method of extraction and the choice of solvents have a significant effect on the PC extraction. CPE, which afforded the best yields in PC extraction could be used as a pre-purification step in, as only its organic phase is exploited (aqueous phase is PC-avoid) (Tanniou unpublished data). For the classic S/L phenolic extraction, numerous solvents of different polarities have been used, with usually methanol or acetone as the solvents more appreciated for seaweeds [3]. In this work, we decided to use ethanol-based solvents and ethyl acetate to be able to compare with alternative processes involving both types of solvents (ethanol for PLE conditions and ethyl acetate for CPE conditions). Although ethanol has been reported as an inefficient PC solvent in "classic" conditions [13, Tanniou unpublished data], its use under PLE conditions has been reported in the literature together with hexane and methanol [17,39]. In our study ethanol–water 75:25 and 25:75 mixtures yield the same TPC in duplicated extracts. Similar trends were found with another brown macroalga *Himanthalia elongata*, in which comparable yields were obtained when extracting with ethanol and with water [17]. Similar phenolic compounds were extracted whatever the used EtOH–water mixture but the extracts did not have the same polarity, being more polar than the extracts obtained with an EtOH–water 25:75 mixture.

In our study, TPC was expressed in percentage dry weight of seaweed and a maximal value of 4.5%DW was obtained for *S. muticum* whatever the process. Different TPCs were obtained on the same species by other authors who found values between 0.2 and 6%DW [15,45]. TPC depends on the environment parameters and/or of the seaweed thallus part kept for extraction [45]. Here, to have a homogeneous algal material, the totality of the thallus was kept for extraction. In the same way algae were collected in summer when they usually produce the maximum of PC [4,15]. However this quantity varies between sites (depending on environmental conditions). All these considerations could explain why TPCs were different between these experimental studies. For the same species, following sites, seasons and thallus portion, PC contents vary, together with the polarity of compounds extracted. Indeed compounds within the pool of PC in *S. muticum* have not the same polarity even if they are all of fucophlorethols type (Tanniou unpublished data-2D RMN) and the proportion of a specific compound within the pool is going to vary also in relation with the environmental data of the considered site as well as with the season (not yet published data).

Different types of phenolic compounds were present within the extract from *S. muticum* representing a PC pool. Our interest was to find a method which would optimize the extraction of this PC pool both qualitatively (all chemical species) and quantitatively (no activity denaturation). Folin test quantified PC and NMR profiles allowed, first to ensure that PC were present within the extract (disregarding interfering aromatics in the colorimetric assay), and hence to check if the extracted pool was similar to the one initially present in the alga. Finally, ^{1}H NMR was used to obtain a phenolic fingerprinting of the overall extracts to find out which compounds should be removed in a future PC purification. Thus, compared to the HR-MAS NMR spectrum used as reference, the almost totality of compounds initially present in *S. muticum* was extracted thanks to the PLE EtOH 75 process. Conversely, NMR spectra showed very different compound profiles between SFE and the pool of PC initially present in the algae (as evidenced in the HR-MAS NMR profile). Regarding the hexane–EtOH control which presents a polarity close to the CO_2–EtOH mixture used in

SFE, the observed difference in NMR profiles can be explained by the mixture polarity which would not allow the extraction of the same PC as with the other techniques. Indeed, the hexane–EtOH mixture is too apolar to allow a PC extraction. It is important to underline also the fact that for the obtaining of RMN spectra, extracts were all dissolved in Deutered Methanol (MeOD), not allowing entire PC pool solubilization but only the soluble part, having the same polarity. MeOD was chosen in regard with results showing that the majority of *S. muticum* PC had an affinity for the MeOH, as demonstrated by Tanniou (unpublished data) using the solid phase extraction (SPE) process but also cited by [4,10,45]. It also allowed the alignment of NMR spectra to obtain a global view of the differences between the various extraction processes.

Even if it was reported by many authors that PC are sensitive to high temperatures, other authors showed the opposite and demonstrated the positive effect of the increase of temperature on the extraction yield [17,46, Tanniou unpublished data]. This phenomenon can also depend on exposure time, of very limited duration in our case to reduce temperature degradation. Pressure level can also impact PC; indeed some authors used more important pressures (20–40 MPa) [38,47] than those used in our study (15 Mpa) without reporting any modification of their end products. Moreover, other works reported extraction times four times longer than ours, i.e. 6 h [47] compared to 1 h 30 min here. Our results, especially for CPE and PLE, are really promising in terms of efficiency.

Concerning active compounds, one should retain that the choice of the extraction solvent is important in preserving PC activity. In our study, the EA–water mixture always produced the most active extracts, whatever the method used. In this respect, conventional methods afforded better activities than alternative ones. As mentioned, high temperature used by some processes can have a detrimental effect on the PC. In fact, for the EtOH:water and hexane–EtOH mixtures, there was a decrease in activity between conventional and alternative processes, suggesting that the temperature may play a negative role on the extracted compounds activity. Indeed, in other studies, an activity decrease with an increase of temperature has been reported in PLE [17], but this was not confirmed as a general trend for other solvents. EA extracts had very interesting activities similar to those obtained from positive controls (IC50: 0.52 ± 0.03 and 0.45 ± 0.01 mg mL^{-1} and AAC_{700}: 0.58 ± 0.33 and 0.18 ± 0.01 mg mL^{-1} for the alternative and classical extraction methods, respectively) and higher than those obtained for the same species with other extraction solvents [10]. CO_2–EtOH and hexane–EtOH extracts had DPPH and good β-carotene activities (IC50: 28.31 ± 4.20 and 2.60 ± 0.20 mg mL^{-1}, and AAC_{700}: 0.72 ± 0.22 and $2.4610^{-4} \pm 5.2810^{-6}$ mg mL^{-1} for the alternative and classical extraction methods, respectively). Regarding NMR profiles, β-carotene activity was due to non-polar compounds such as lipids rather than PCs. As already shown in the literature, active extracts shown by the DPPH test were not necessarily identical to those identified by the β-carotene test [10]. Indeed, β-carotene test targets lipophilic compounds activity while the DPPH is less selective [44]. In our study, the most active extracts (EA:water classical and CPE) shown by the DPPH were also shown by β-carotene, suggesting a lipophilic nature to the active compounds, with an affinity for non-polar solvents. Fractions of the phenolic pool may undergo oxidative polymerization in the apoplasm, and thus be integrated as components of the parietal macromolecular complex, upon which their original solubility and solvent affinity characteristics are completely modified [48]. Similarly, if we consider only at the solvent effect, the more polar the used solvent is, the less activity shown by β-carotene test.

We also noticed that active extracts with DPPH are also the ones containing more PC with regard to the Folin–Ciocalteu assay. This report was also made by other authors [45,49–51]. It could let believe in a direct correlation between CP and antioxidant activity, even if several authors denied this and attribute activities to other secondary metabolites produced by the seaweed [52]. The Folin–Ciocalteu component of the test used to quantify PC not only measures total phenol content, but also reacts with any reducing substances. This reagent therefore measures the reducing capacity of the totality of the sample, and not only the level of phenolic compounds [53]. Thus it is not surprising to find a correlation between the DPPH results and those obtained by the Folin–Ciocalteu assay. In our case this procedure remained interesting to permit a comparison between our results and those obtained in the literature.

Compared with other processes, solvent extraction with EA resulted in the highest TPCs and antioxidant activities. Our results clearly demonstrated that CPE could concern an initial separation or purification of the extract. Indeed, only the organic phase of the biphasic extract (composed of $20.74 \pm 0.32\%$ PC) was kept here. The NMR spectra showed none or negligible amounts of mannitol, a major interfering polar component. This process thus allowed obtaining within minutes a fraction with a huge content of PC. However, ethyl acetate is not recommended in subsequent processing steps because of its inherent toxicity. Our study underlined that alternative processes were much more effective than the classic S/L extraction. Indeed they can often save time and solvent used even if the final yields in PC are somewhat inferior, with the exception of CPE. Regarding the productivity in standard S/L extraction, it increased with solvent polarity, which would mean that polar solvents allowed extracting more phenolic compounds. Others authors made the same report connecting the extraction yield with the increase of solvent polarity [17], but at the expense of including large amounts of mannitol which upsets accurate yield estimates, the large ^{1}H NMR signals of the latter interfering with the more upfield phenolic signals and spoiling the central part of the spectrum baseline (see Fig. 2, NMR).

If the main interest is on active compounds characterization, one would better focus on a process allowing phenolics extraction in large quantities, e.g. CPE. On the other hand, if a tradeoff between activity and market regulations for food products is sought, a process using water:ethanol mixtures that better complies with stringent European standards is more appropriate. In this respect, PLE allowed obtaining rich PC fractions produced in a very effective way may be a sound candidate for industrial applications, being both more tractable for scaling-up and certainly more green, notwithstanding the seasonal availability of the natural resource, in this case an invasive species.

For further analyses, to still improve the extraction process, it would be interesting to combine some of these processes. SFE and PLE are well suited for on-line and off-line combination with analytical techniques such as liquid chromatography. For this study, on-line coupling is not needed since sample analysis was not performed afterwards and the selection of the extraction process was based on in vitro measurements using micro-plates. On the other hand, the combination of extraction techniques with in-cell cleanup (solid-phase extraction, SPE) has been proposed recently for the optimization of the extraction of selected analytes (phenolics) in different algae; the on-line SPE/SFE technique helped improving the selectivity of the extraction process [54]. Similarly, PLE was suggested in combination with in-cell SPE to isolate the target compounds by retention in the SPE material of either the target compounds or the interferences [55].

Finally, maintenance considerations are to be considered for sustainable operability despite the excellent productivities reached by alternative processes such as SFE, PLE and CPE, we must not forget that these processes have very long cleaning operations that should also be taken into account. Similarly the

energy cost (high pressure and high temperature energy-intensive) together with the price of such apparatus to realize such processes must not to be neglected.

5. Conclusion

Our study demonstrates for the first time the unquestionable usefulness of using alternative, solvent-free and green methods for the non-denaturing extraction of brown algal polyphenols, using the brown macroalga *S. muticum* as model. Several extraction solvents and processes were tested here to obtain active phenolic compounds from *S. muticum* samples collected in Brittany (France). In particular, CPE and PLE seemed the most promising for the extraction of polyphenols that are endowed with useful antioxidant potential. First, CPE afforded the most important yields in concentrated phenolic compounds, also displaying the best associated activities. Secondly, PLE using an EtOH:water mixture 75:25 (v/v) allowed a good PC extraction with huge efficiency. Despite a lesser activity of the extracts, PLE is green (environmentally-safe) and potentially complies with the European requirements for the prospective valorization of phenolic compounds from *S. muticum* in Brittany.

Acknowledgments

This study is part of the Ph.D. thesis work carried out by the first author within the Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR UMR 6539) set at the IUEM (UBO-UEB). It was supported by the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de Recherche (UBO allocation). Authors would like to thank M.A. Poullaouec, I. Bihannic, students and staff of the Research Group; all the CSIC team, Madrid and G. Roelens from the Gepea laboratory for their help and advices. This project is related to two research programs: Phlorotann-ING (GIS Europôle Mer, 2010-2012) and Biotecmar (Interreg IVB, 2009-2011).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.088.

References

[1] M.E.A. Schoenwaelder, M.N. Clayton, J. Phycol. 34 (1998) 969–980.
[2] M.A. Ragan, K.-W. Glombitza, Prog. Phycol. Res. 4 (1986) 129–241.
[3] R. Koivikko, J. Loponen, T. Honkanen, V. Jormalainen, J. Chem. Ecol. 31 (2005) 195–212.
[4] E. Plouguerné, K. Le Lann, S. Connan, G. Jechoux, E. Deslandes, V. Stiger-Pouvreau, Aquat. Bot. 85 (2006) 337–344.
[5] N. Bourgougnon, V. Stiger-Pouvreau, in: S.-K. Kim (Ed.), Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology, 2011, pp. 58–105.
[6] M. Nakai, N. Kagayama, K. Nakahara, W. Miki, Mar. Biotechnol. 8 (2006) 409–414.
[7] T. Kuda, T. Kunii, H. Goto, Food Chem. 103 (2007) 900–905.
[8] S. Kumar Chandini, P. Ganesan, N. Bhaskar, Food Chem. 107 (2008) 707–713.
[9] V. Stiger, E. Deslandes, C.E. Payri, Bot. Mar. 47 (2004) 402–409.
[10] K. Le Lann, C. Jégou, V. Stiger-Pouvreau, Phycol. Res. 56 (2008) 238–245.
[11] T. Wang, R. Jónsdóttir, G. Ólafsdóttir, Food Chem. 116 (2009) 240–248.
[12] F. Breton, S. Cérantola, E.Ar. Gall, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 399 (2010) 167–172.
[13] A. López, M. Rico, A. Rivero, M. Suárez de Tangil, Food Chem. 125 (2011) 1104–1109.
[14] S.H. Lee, S.M. Kang, S.C. Ko, D.H. Lee, Y.J. Jeon, Biochem. Biophys. Res. Commun. 420 (2012) 576–581.
[15] K. Le Lann, S. Connan, V. Stiger-Pouvreau, Mar. Environ. Res. 80 (2012) 1–11.
[16] K. Le Lann, C. Ferret, E. VanMee, C. Spagnol, M. Lhuillery, V. Stiger-Pouvreau, Phycol. Res. 60 (2012) 37–50.
[17] M. Plaza, S. Santoyo, L. Jaime, G. García-Blairsy Reina, M. Herrero, F.J. Senoráns, E. Ibánez, J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 450–455.
[18] Z. Djarmati, R.M. Jankov, E. Schwirtlich, B. Djulinac, A. Djordjevic, J. Am. Oil Chem. Soc. 68 (1991) 731–734.
[19] T. Muehlnikel, Food Market. Technol. 6 (1992) 37–38.
[20] U. Nguyen, G. Evans, G. Frakman, in: S.S.H. Rizvi (Ed.), Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials, Blackie, Glasgow, 1994, p. 103.
[21] D. Gerard, K. Quirin, E. Schwarz, Food Market. Technol. 9 (1995) 46–55.
[22] M.T. Tena, M. Valcarcel, P. Hidalgo, J.L. Ubera, Anal. Chem. 69 (1997) 521–526.
[23] E. Ibanez, A. Kubatova, J. Senorans, S. Cavero, G. Reglero, S.B. Hawthorne, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 375–382.
[24] E.S. Ong, J.S.H. Cheong, D. Goh, J. Chromatogr. A 1112 (2006) 92–102.
[25] L. Onofrejová, J. Vasícková, B. Klejdus, P. Stratil, L. Misurcová, S. Krácmar, J. Kopeck, J. Vacek, J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 464–470.
[26] M. Hamzaoui, J. Hubert, J. Hadj-Salem, B. Richard, D. Harakat, L. Marchal, C. Lavaud, J.H. Renault, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5254–5262.
[27] A Taamalli, D. Arráez-Romá, E. Barrajón-Catalán, V. Ruiz-Torres, A. Pérez-Sánchez, M. Herrero, E. Ibañez, V. Micol, M. Zarrouk, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Food Chem. Toxicol. 50 (2012) 1817–1825.
[28] A. Marston, K. Hostettmann, J. Chromatogr. A 21 (2006) 181–194.
[29] G.F. Pauli, S.M. Pro, J.B. Friesen, J. Nat. Prod. 71 (2008) 1489–1508.
[30] K.D. Yoon, Y.W. Chin, M.H. Yang, J. Kim, Food Chem. 129 (2011) 679–683.
[31] R. Margraff, O. Intes, J.H. Renault, P. Garret, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 28 (2005) 1893–1902.
[32] I.A. Sutherland, G. Audo, E. Bourton, F. Couillard, D. Fisher, I. Garrard, P. Hewitson, O. Intes, J. Chromatogr. A 1190 (2008) 57–62.
[33] A. Toribio, J.-M. Nuzillard, B. Pinel, L. Boudesocque, M. Lafosse, F. de la Poype, J.-H. Renault, J. Sep. Sci. 32 (2009) 1801–1807.
[34] P.T. Anastas, J.C. Warner, Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, New York, 1998.
[35] P.D. Steinberg, in: V.J. Paul (Ed.), Ecological Roles of Marine Natural Products, Cornell University Press, Ithaca, 1992, pp. 51–92.
[36] E. Plouguerné, C. Hellio, E. Deslandes, B. Véron, V. Stiger-Pouvreau, Bot. Mar. 51 (2008) 202–208.
[37] A. Silkina, A. Bazes, J.L. Mouget, N. Bourgougnon, Mar. Pollut. Bull. 64 (2012) 2039–2046.
[38] I. Borrás Linares, D. Arráez-Román, M. Herrero, E. Ibánez, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 7682–7690.
[39] M.E. Borges, R.L. Tejera, L. Díaz, P. Esparza, E. Ibáñez, Food Chem. 132 (2012) 1855–1860.
[40] S. Santoyo, I. Rodríguez-Meizoso, A. Cifuentes, L. Jaime, G. García-Blairsy Reina, F.J. Señorans, E. Ibáñez, LWT Food Sci. Technol. 42 (2009) 1213–1218.
[41] P. Sanoner, S. Guyot, N. Marnet, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 4847–4853.
[42] G.B. Toth, H. Pavia, J. Chem. Ecol. 27 (2001) 1899–1910.
[43] C. Kaur, H.C. Kapoor, Int. J. Food Sci. Technol. 37 (2002) 153–161.
[44] I.I. Koleva, T.A. Van Beek, J.P.H. Linssen, Phytochem. Anal. 13 (2002) 8–17.
[45] S. Connan, F. Delisle, E. Deslandes, E.Ar. Gall, Bot. Mar. 49 (2006) 39–46.
[46] I. Rodríguez-Meizoso, L. Jaime, S. Santoyo, F.J. Señoráns, A. Cifuentes, E. Ibáñez, J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 456–463.
[47] P.F. Leal, M.B. Kfouri, F.C. Alexandre, F.H.R. Fagundes, J.M. Prado, M.H. Toyama, M.A.A. Meireles, J. Supercrit. Fluids 54 (2010) 38–45.
[48] U.H. Lüder, M.N. Clayton, Planta 218 (2004) 928–937.
[49] A. Jiménez-Escrig, I. Jimenez-Jimenez, R. Pulido, F. Saura-Calixto, J. Sci. Food Agric. 81 (2001) 530–534.
[50] E. Peréz-Rodriguez, J. Aguilera, I. Gomez, F.L. Figueroa, Mar. Biol. 139 (2001) 633–639.
[51] M. Zubia, M.S. Fabre, V. Kerjean, K.L. Lann, V. Stiger-Pouvreau, M. Fauchon, E. Deslandes, Food Chem. 116 (2009) 693–701.
[52] M.S. Deal, M.E. Hay, D. Wilson, W. Fenical, Oecologia 136 (2003) 107–114.
[53] D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 1841–1856.
[54] B. Klejdus, J. Kopecky, L. Benesova, J. Vacek, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 763–771.
[55] P. Haglund, E. Spinnel, LC GC Asia Pac. 13 (2010) 6–12.

II.3.4. Discussion

II.3.4.1. Extraction de Partage Centrifuge (EPC)

Lors de l'étude préliminaire, les composés phénoliques extraits par EPC pour les deux espèces *S. muticum* et *A. nodosum* et leurs activités antiradicalaires et antioxydantes associées, se répartissent de façon similaire entre les phases 1 à 4, et différemment dans le résidu (Figure II.16). Quelle que soit l'espèce considérée, la quantité de CP contenue dans les différentes fractions diminue en fonction de l'avancement de l'expérience. Quelque soit l'espèce considérée les résidus contiennent encore beaucoup de composés ce qui signifie que la matière algale n'a pas été épuisée lors de la manipulation. Il faudrait donc tester de plus longs temps de séjour pour s'assurer que la séparation est bien totale.

En ce qui concerne les activités des différentes fractions, on remarque que celles-ci vont avoir tendance à augmenter légèrement au cours de l'expérience, les composés les plus actifs se retrouvent donc en bout de colonne ce qui signifierait qu'ils auraient besoin de plus de temps de contact pour passer en phase organique (AE). Il se pourrait qu'ils aient moins d'affinité pour ce solvant ou qu'ils soient liés à des composés ayant plus d'affinité pour la phase aqueuse. L'activité antioxydante a quant à elle tendance à diminuer en cours d'expérience. Enfin, quelle que soit l'espèce considérée, les activités sont très importantes dans les résidus. Ce qui suggère une forte activité des composés ayant moins d'affinité pour le solvant et ce qui confirme les hypothèses citées plus haut. Il serait donc bien nécessaire d'augmenter le temps de séjour.

La RMN du proton a bien confirmé les tendances mises en évidence par le test colorimétrique de Folin-Ciocalteu. En effet, on a bien une diminution de la quantité de CP au cours de l'expérience et il y a bien des CP résiduels dans la fraction récupérée après rinçage de l'appareil. Ce qui montre encore l'intérêt d'une telle technique pour l'analyse rapide des échantillons et pour vérifier les mesures quantitatives effectuées par dosage colorimétrique. Par ailleurs, comme vu dans l'annexe n°1, des couplages en ligne sont possibles entre la CPC et la RMN par exemple (Spraul *et al*., 1997). Cependant, ce genre de couplage nécessite l'obtention d'extraits relativement « propres » afin de pouvoir visualiser les composés recherchés. Nous avons vu que cela n'était pas possible dans le cas de *S.muticum*. Il faudrait donc procéder à des étapes de semi-purification en amont afin de diminuer la proportion des molécules « gênantes » pour la visualisation en RMN. Des systèmes ont été conçus dans d'autres études dans ce but et font intervenir successivement des étapes de CPC et d'HPLC suivi d'une visualisation en UV-MS par exemple (Michel T, 2011) qui permet de suivre le fractionnement directement en sortie de CPC, et permet d'obtenir des informations structurales des molécules fractionnées grâce à la Masse. Cette méthodologie pourrait donc être testée ici comme une nouvelle approche pour la séparation et l'identification rapide de produits naturels.

Cette étude nous a permis de voir que cette technique permettait de traiter des modèles algaux assez différents et offre donc de grandes possibilités pour la suite des investigations dans ce domaine. Par ailleurs, ici seul un mélange biphasique et un essai de mélange triphasique ont

été utilisés. Il existe une grande variété de mélanges déjà testés en CPC pour l'extraction de molécules naturelles. Ce qui permet d'adapter cette technique à de nombreux modèles très différents. En effet, des systèmes couvrant toute la gamme de polarité et constitués de deux à cinq solvants sont aujourd'hui utilisés en routine pour le fractionnement d'extraits végétaux par exemple (Oka *et al*., 1991 ; Foucault, 1994 ; Berthod *et al*., 2005b). Cependant ces mélanges font souvent intervenir des solvants toxiques pour certains d'entre eux tels que l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'hexane ou encore l'acétonitrile (Oka *et al*., 1991 ; Foucault, 1994 ; Berthod *et al*., 2005b ; Ito, 2005).

II.3.4.2. Extraction par fluide pressurisé et fluide supercritique

Les différents procédés d'extraction alternatifs (PLE et SFE) ont un effet significatif sur la teneur en CP chez les trois espèces considérées : *S.muticum*, *A.nodosum* et *P. littoralis*. Toutes espèces confondues, la PLE utilisant un mélange éthanolique à 75% (v/v) est le procédé le plus efficace pour l'extraction des CPs. Le procédé le moins efficace est l'extraction utilisant le CO_2 supercritique (SFE). Dans tous les cas, il permet d'extraire moins de 1% de CP par rapport à la matière sèche de l'algue. L'utilisation d'un mélange à 25% en PLE permet d'extraire un peu moins de la moitié des composés phénoliques par rapport à la PLE 75%. Cela signifierait que les composés phénoliques présents chez ces trois espèces auraient une polarité quasi similaire puisqu'on observe les mêmes tendances.

Les spectres obtenus en RMN du proton permettent de valider la présence de composés aromatiques dans les extraits obtenus. Pour *Ascophyllum nodosum* on remarque que les signaux sont cependant assez faibles pour deux des techniques testées (SFE et PLE 25%). Cela pourrait s'expliquer par la présence de Mannitol (entre 3.6 et 3.9 ppm) en très grande quantité dans les extraits qui masquerait les autres signaux moins importants. D'autre part, même si les composés semblent avoir des polarités proches chez les différentes espèces nous sommes bien en présence de pool de composés différents comme en atteste la forme des signaux, très différente d'une technique et d'une espèce à l'autre. Pour *A. nodosum*, on observe par ailleurs un pic unique (singulet) vers 6.45 ppm avec l'utilisation de la PLE 25%, ce pic pourrait correspondre à du phloroglucinol seul comme il en a été trouvé chez cette espèce d'algue brune (Jégou, 2011).

Les extraits obtenus ont par ailleurs des activités anti-radicalaires et anti-oxydantes comparables aux molécules utilisées dans le commerce. Comme pour la teneur en CP, ce sont les techniques PLE qui permettent d'obtenir les activités les plus importantes. On peut d'ailleurs en déduire que la teneur en composés phénoliques n'est pas étrangère aux activités mesurées et qu'on serait bien en présence de composés phénoliques actifs.

II.3.4.3. Comparaison des procédés innovants (SFE, PLE, EPC) avec l'extraction S/L classique

Cette étude a permis de tester différentes méthodes pour l'extraction de composés phénoliques actifs à partir de l'algue modèle *S.muticum*. Tous les extraits obtenus par les

procédés classiques et alternatifs sont composés à plus de 10 % par des composés phénoliques à part ceux obtenus par des mélanges CO_2-ETOH ou Hexane-EtOH. Le choix de la méthode et du solvant d'extraction a donc un effet significatif sur l'extraction de CP. L'EPC, permettant les meilleurs rendements d'extraction de CP pourrait être utilisée en tant qu'étape de pré-purification si on travaille seulement sur la phase organique (la phase aqueuse contenant peu de CP). Pour l'extraction S/L « classique », de nombreux solvants aux polarités différentes peuvent être utilisés. Le plus souvent le méthanol et l'acétone sont préférés pour extraire les CP à partir d'algues (Koivikko *et al*., 2005). Dans ce travail, nous avons utilisé des mélanges à base d'éthanol et d'acétate d'éthyle afin de comparer les résultats obtenus par extraction S/L avec ceux obtenus par les procédés alternatifs impliquant les deux types de solvants (l'éthanol pour l'extraction PLE et l'acétate d'éthyle pour l'EPC). Bien que l'éthanol soit inefficace dans des conditions "classiques" (Lopez *et al*., 2011), son utilisation en PLE est souvent décrite dans la littérature (Plaza *et al*., 2010 ; Borges *et al*., 2012). Dans notre étude, les mélanges Eau-éthanol 75:25 et 25:75 permettent l'extraction de la même quantité de CP. Des tendances semblables ont été décrites pour une autre macroalgue brune *Himanthalia elongata*, pour laquelle des rendements comparables ont été obtenus avec l'éthanol ou l'eau comme solvant d'extraction (Plaza *et al*., 2010). Bien que des quantités de composés phénoliques semblables aient été obtenues par ces deux mélanges, les extraits n'avaient pas la même polarité, le mélange EtOH-eau 25:75 étant plus polaire que le mélange 75 :25.

Dans notre étude, la quantité maximale de CP extraite indépendamment du procédé, représentait 4.5 % du Poids Sec de l'algue. Des quantités de CP semblables ont été obtenues sur la même espèce par d'autres auteurs qui ont mesuré des teneurs variant de 0.2 à 6 %PS (Le Lann *et al*., 2012a,b ; Connan *et al*., 2006). La quantité de CP contenus dans les algues dépend des paramètres d'environnementaux et/ou de la partie du thalle utilisée pour l'extraction (Connan et al., 2006). Ici, pour avoir un matériel algal homogène, la totalité du thalle a été gardée pour l'extraction. De la même façon les algues ont été récoltées en été où elles produisent en général d'avantage de CP (Plouguerné *et al*., 2006 ; Le Lann *et al*.,2012a,b). Cependant, cette quantité peut varier suivant les sites d'échantillonnage. Toutes ces considérations pourraient expliquer les différences observées dans la littérature. Par ailleurs, en plus de leur quantité, la qualité des CP peut également varier en fonction de ces mêmes paramètres. En effet les composés composant le pool de composés phénoliques extraits à partir de *S. muticum* n'ont pas tous la même polarité même s'ils sont tous de type fucophlorethols (chapitre III) et la proportion des composés de ce pool va varier aussi en fonction des paramètres environnementaux, du site considéré ainsi que de la saison (chapitre III).

Notre intérêt était de trouver une méthode qui permet l'extraction de la majorité des composés phénoliques composant ce pool que ce soit quantitativement et qualitativement (aucune dénaturation, ni perte d'activité). Les profils RMN ont permis, d'abord de s'assurer que les CP était bien présents dans l'extrait (pour confirmer les résultats obtenus par dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu), et par conséquent de vérifier si le pool de composés extraits était semblable à celui présent initialement dans l'algue. Finalement, la RMN a été utilisée pour obtenir une empreinte chimique globale des extraits et pour savoir quels composés devraient être

enlevés lors d'une future purification. Ainsi, comparé au spectre HR-MAS NMR utilisé comme référence, la quasi-totalité des composés phénoliques initialement présents dans *S. muticum* a été extraite grâce au procédé PLE EtOH75. Au contraire, les extraits obtenus par SFE présentent des profils phénoliques RMN très différents de ceux initialement présents dans les algues (comme en témoigne le spectre HR-MAS NMR). Quant au contrôle S/L utilisant un mélange Hexane-EtOH de polarité proche de celle du mélange CO_2-ETOH utilisé en SFE il ne permet pas l'extraction de CP. En effet, le mélange Hexane-EtOH est trop apolaire pour permettre une extraction des CP. Il est important de souligner aussi le fait que pour l'obtention de spectres RMN, les extraits ont été tous dissous dans le Méthanol Deuteré (MeOD), ne permettant pas la solubilisation de la totalité du pool de CP, mais seulement la partie soluble, ayant la même polarité. Le MeOD a été choisi car la majorité des PC de *S.muticum* ont une affinité pour le MeOH, comme démontré précédemment et par de nombreux auteurs (Plouguerné *et al*., 2006 ; Le Lann *et al*.,2008 ; Connan *et al*., 2006).

Même si certains auteurs ont rapporté que les CP étaient sensibles à de fortes températures, d'autres à l'inverse démontrent l'effet positif de l'augmentation de température sur le rendement d'extraction (Plaza *et al*., 2010 ; Rodriguez-Meizoso *et al*., 2010). L'effet de la température dépend également du temps d'exposition ; celui-ci étant très court dans notre étude il permettrait ainsi en théorie de réduire la potentielle dégradation engendrée par de trop fortes températures. De même on pourrait s'attendre à observer un effet négatif de fortes pressions sur la quantité et/ou qualité des composés phénoliques. Pourtant, certains auteurs ont utilisé des pressions plus importantes (20-40MPa) (Borrás Linares *et al*., 2011 ; Leal *et al*., 2010) que celles utilisées dans notre étude (15 Mpa) sans rapporter de modifications de leurs produits finis. De plus, dans ces travaux des temps d'extraction quatre fois plus importants que ceux employés dans notre étude (Leal *et al*., 2010) ont été utilisés. Nos résultats, et en particulier ceux obtenus par EPC et PLE, sont donc vraiment prometteurs en terme d'efficacité.

En ce qui concerne l'activité des composés, le mélange d'EA-eau permet d'obtenir les extraits les plus actifs, indépendamment de la méthode utilisée. Pour les autres solvants, l'extraction S/L « classique » permet l'obtention d'extraits plus actifs comparés aux procédés alternatifs. Comme mentionné plus haut, la température élevée utilisée dans certains procédés peut avoir un effet dénaturant sur les CP. Ainsi, pour les mélanges EtOH:water et Hexane-EtOH, on observe une diminution de l'activité entre les processus classiques et alternatifs, suggérant que la température peut jouer un rôle négatif sur l'activité des composés extraits. En effet, dans d'autres études, une diminution de l'activité avec l'augmentation de la température d'extraction a été rapportée pour la PLE (Plaza *et al*., 2010), mais ceci n'a pas été confirmé pour d'autres solvants. Les extraits obtenu avec l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction ont des activités très intéressantes semblables à celles obtenues sur les contrôles positifs (IC_{50} : 0.52 ± 0.03 et 0.45 ± 0.01 $mg.mL^{-1}$ et AAC_{700} : 0.58 ± 0.33 et 0.18 ± 0.01 $mg.mL^{-1}$ pour les méthodes d'extraction alternatives et classiques, respectivement) et plus importantes que celles obtenues pour la même espèce avec d'autres solvants d'extraction (Le Lann *et al*., 2008). Les extraits obtenus avec les mélanges CO_2-ETOH et Hexane-EtOH n'ont pas d'activité anti-radicalaire mais ont montré de bonnes activités anti-oxydantes (IC_{50}: 28.31 ± 4.20 et 2.60 ± 0.20 $mg.mL^{-1}$ et

AAC_{700} : 0.72 ± 0.22 et $2.46.10^{-4} \pm 5.28.10^{-6}$ $mg.mL^{-1}$ pour les méthodes d'extraction alternatives et classiques, respectivement). Comme le confirment les profils RMN, l'activité antioxydante serait plutôt due aux composés non-polaires comme des lipides plutôt qu'aux composés phénoliques.

Nous avons aussi remarqué que les extraits ayant une forte activité anti-radicalaire sont aussi ceux contenant des CP en grande quantité. Ce constat a été fait par d'autres auteurs (Connan *et al*., 2006 ; Jiménez-Escrig *et al*., 2001 ; Peréz-Rodriguez *et al*., 2001 ; Zubia *et al*., 2009). Ces résultats laissent croire en une corrélation directe entre la teneur en CP et l'activité d'anti-radicalaire, même si plusieurs auteurs ont démontré le contraire et attribuent ces activités à d'autre métabolites secondaires produits par les algues (Deal *et al*., 2003). Le dosage Folin-Ciocalteu utilisé habituellement pour la quantification des CP mesure non seulement la teneur totale en composés aromatiques, mais réagit aussi avec n'importe quelle substance réductrice. Ce réactif mesure donc la capacité de réduction totale de l'échantillon et pas seulement la quantité de composés phénoliques (Huang *et al*., 2005). Ainsi il n'est pas surprenant de trouver une corrélation entre les résultats du test DPPH et ceux obtenus par le dosage Folin-Ciocalteu. Dans notre cas cette procédure reste intéressante car elle permet de comparer nos résultats à ceux obtenus dans la littérature.

Comparé avec d'autres procédés, l'extraction à l'acétate d'éthyle permet d'obtenir une fraction riche en CP actifs. Nos résultats ont montré que l'EPC pourrait être employée comme une étape de pré-purification de l'extrait. En effet, seulement la phase organique de l'extrait biphasique obtenu (composé de 20.74 ± 0.32 % de CP) a été gardée ici. Les spectres NMR ne montrent pas ou peu de mannitol dans les extraits obtenus. Ce procédé a permis d'obtenir en quelques minutes une fraction riche en CP actifs. Cependant, on ne recommandera pas l'acétate d'éthyle pour des expériences ultérieures à cause de sa toxicité inhérente. Notre étude a souligné que des processus alternatifs étaient beaucoup plus efficaces que l'extraction S/L classique. En effet, ils permettent souvent de gagner du temps et d'utiliser moins de solvant même si les rendements sont inférieurs à ceux obtenus par extraction S/L (à l'exception de l'EPC). Si on s'intéresse à la productivité de l'extraction S/L classique, elle augmente avec la polarité du solvant utilisé, ce qui signifierait que les solvants polaires ont permis d'extraire plus de composés phénoliques. D'autres auteurs ont fait le même constat reliant l'augmentation du rendement d'extraction à l'augmentation de la polarité du solvant (Plaza *et al*., 2010).

On précisera que le choix de la technique et du solvant dépend également des applications recherchées. Ainsi, si on cherche à caractériser les composés actifs, on préférera un procédé permettant l'extraction de CP en grande quantité comme l'EPC par exemple. D'autre part, si un compromis entre activité et utilisation des extraits sur le marché est recherché, un procédé utilisant des mélanges Eau:éthanol satisfaisant aux normes européennes rigoureuses est plus approprié. À cet égard, la PLE a permis d'obtenir des fractions riches en composés phénoliques de façon très efficace et serait donc une bonne candidate pour de futures applications industrielles, étant tant plus facilement transposable à grande échelle et certainement plus écorespectueuse.

Il serait intéressant, lors de futures analyses, de combiner certains de ces processus. La SFE et la PLE sont déjà utilisées couplées en ligne avec des techniques analytiques comme la chromatographie liquide. D'autre part des combinaisons de techniques peuvent être employées sur de la biomasse algale comme par exemple la technique SPE (Solide Phase Extraction ou Extraction en phase solide) couplée en ligne avec la SFE qui permet d'améliorer la sélectivité du processus d'extraction (Klejdus *et al*., 2009). De même la PLE a été utilisée en association avec la SPE dans la cellule d'extraction afin d'isoler les composés cibles adsorbés sur la colonne (Haglund et Spinnel, 2010).

Finalement, les considérations de maintenance doivent être prises en compte car malgré les productivités excellentes atteintes grâce aux procédés d'extraction alternatifs comme la SFE, PLE et EPC, nous ne devons pas oublier que ces processus nécessitent des étapes de nettoyage très longues. De la même façon le coût énergétique (les hautes pressions et la température élevée sont consommatrices d'énergie) et le coût des équipements ne doivent pas être négligés.

II.3.5. Conclusion

Notre étude a démontré pour la première fois l'intérêt d'utiliser des procédés alternatifs pour l'extraction « verte » et sans solvants toxiques de composés phénoliques à partir d'algues brunes sans les dénaturer. Plusieurs solvants et procédés ont été testés ici afin d'obtenir une fraction de composés actifs à partir d'échantillons de *S.muticum*. L'EPC et la PLE en particulier, semblent être prometteuses pour l'extraction de polyphénols aux activités anti-radicalaires intéressantes.

1) Premièrement, l'EPC permet l'obtention d'un rendement d'extraction important ainsi que l'obtention d'une fraction active concentrée en CP.

2) Deuxièmement, la PLE employée avec un mélange Ethanol-Eau permet une extraction optimale des CP actifs avec une haute efficacité. Malgré une activité moins importante des composés obtenus par PLE, celle-ci reste la méthode la plus « verte » et répond donc potentiellement aux normes européennes pour une future valorisation de ces extraits.

II.4. Travail préparatoire à l'extraction

L'objectif est de déstructurer la matière afin de favoriser l'étape ultérieure d'extraction solide-liquide. Parmi tous les procédés envisageables, nous avons brièvement testé l'extrusion. Ce procédé permet d'accroître les performances de l'extraction (vitesse, rendement, sélectivité) tout en limitant les consommations de solvant et d'énergie. L'extrusion, seule ou combinée avec des enzymes (extrusion réactive), est un procédé thermomécanique qui permet d'augmenter le degré de déstructuration et/ou le mélange de la matière avec les solutions enzymatiques. L'action mécanique permet d'échauffer le mélange permettant ainsi aux enzymes de rester actives dans le cas d'une extrusion réactive mais également de jouer sur la viscosité du mélange dans le cas d'une extrusion simple. Les possibilités d'utilisation de ce procédé sont donc nombreuses. Dans

notre étude, il s'agissait d'une première approche, seules quelques conditions ont donc été testées afin de balayer quelques combinaisons de paramètres expérimentaux tels que la température, le degré d'hydratation de la matière première ou encore la vitesse de rotation des vis.

Le travail mené permettra de répondre à la question suivante :

Des procédés d'extractions thermomécaniques peuvent-ils être utilisés en amont ou en remplacement d'une extraction solide/liquide classique afin d'améliorer les performances d'extraction (rendement, vitesse ou sélectivité) des composés phénoliques recherchés ?

II.4.1.Généralités

II.4.1.1. Définition de l'extrusion

Le procédé d'extrusion consiste à faire passer un produit à travers un orifice de petite dimension (la filière) sous l'action de la pression engendrée par une ou deux vis sans fin de type Archimède (extrudeur mono-vis ou bi-vis). L'extrusion est un procédé n'impliquant classiquement que des phénomènes thermomécaniques. Dans le cas où des réactions se produisent lors de l'expérience, au sein de la machine, on parlera d'extrusion réactive. Il peut s'agir soit de réactions chimiques liées à la présence de réactifs ou de solvants non inertes, soit de réactions biochimiques catalysées par des enzymes. Il s'agit d'une opération complexe faisant appel à deux domaines d'application : la chimie et l'extrusion classique. L'extrudeur sera alors assimilé à un réacteur chimique de type continu. La Figure II.24 présente les principaux éléments constitutifs d'un extrudeur (Colonna *et al*., 1994) :

- un fourreau régulé thermiquement,

- une ou deux vis parallèles (extrudeur mono-vis ou bi-vis),

- un moteur à vitesse variable et un réducteur qui entraîne la ou les vis en rotation,

- une filière,

- des dispositifs d'alimentation en produits solides et liquides à débits variables.

Les produits solides à traiter sont introduits dans l'appareil via la trémie d'alimentation équipée d'une pompe doseuse pour le réglage du débit. Le mélange est transporté le long des vis, où il est soumis à des phénomènes thermomécaniques. Le produit final est mis en forme en passant la filière. En cas de nécessité, les produits liquides sont injectés au niveau de zones non remplies, par l'intermédiaire d'une pompe externe (Vauchel, 2007).

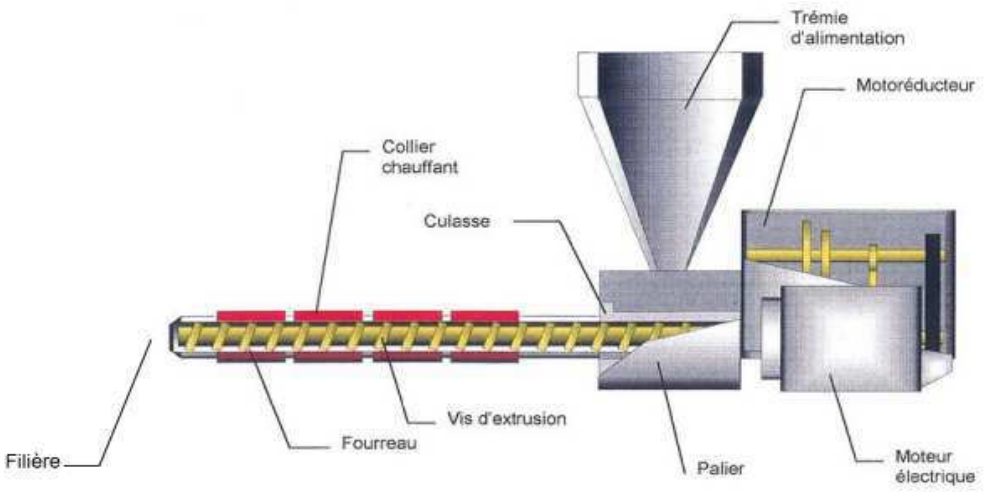


Figure II.24. Schéma général d'un extrudeur et de ses principaux éléments. D'après [5][8].

Dans notre étude, ce sont deux extrudeurs bi-vis qui seront utilisés. L'extrusion au moyen d'un extrudeur bi-vis est un procédé utilisé dans les industries des polymères et de l'agroalimentaire. Il a longtemps été utilisé pour des applications alimentaires avant son application aux polymères il y a une trentaine d'années. Les extrudeurs bi-vis peuvent être utilisés en extrusion réactive. Dans ce type d'extrudeur, le filet d'une vis est en contact permanent avec le chenal de l'autre, en particulier pour les machines de type bi-vis co-rotatives interpénétrées (Figure II.26 E). La matière est constamment en mouvement et est décollée des vis et déplacée vers la filière : l'extrudeur se comporte alors comme une pompe volumétrique (Vauchel, 2007). Il permet en effet un meilleur mélange qu'avec les systèmes mono-vis ce qui va apporter une grande aide lors de l'extrusion réactive par exemple (augmentation de la surface de contact enzyme-substrat).

II.4.1.2. Spécificités de l'extrudeur bi-vis et utilisation pour l'extrusion réactive

Les molécules constitutives de la paroi cellulaire des algues sont principalement des polysaccharides et des protéines. Ces molécules sont organisées de telle façon dans la paroi, que leur récupération est difficile même après broyage de la matière première. Par ailleurs, elles sont parfois liées aux composés phénoliques, rendant par conséquent difficile l'extraction des phlorotannins. L'hydrolyse enzymatique semble être une technique efficace pour libérer l'ensemble de ces constituants pariétaux tout en respectant leurs propriétés. Ce procédé présente cependant quelques inconvénients : comme tout procédé biologique, il doit être réalisé en conditions très contrôlées (notamment pH, température, spécifiques au type d'enzyme). Il est parfois difficile d'inactiver ou de recycler l'enzyme (sans dénaturer le produit).

[8] Référence électronique indexée en fin de manuscrit

L'extrusion réactive s'appuie sur la capacité des extrudeurs à réaliser des réactions chimiques ou enzymatiques dans leur enceinte. L'intérêt de cette technique réside dans le fait de combiner les effets positifs de l'extrusion (déstructuration thermodynamique) et de l'hydrolyse enzymatiques (coupure spécifique des liaisons moléculaires) sur l'extraction de molécules. Les produits utilisés devront alors avoir une forte viscosité, ce qui permettra de limiter considérablement la quantité de solvant à utiliser. Grâce à sa géométrie particulière, l'extrudeur pourra être considéré comme un réacteur chimique de type continu. Pour les modèles semi-industriels, les vis sont constituées d'un assemblage de modules démontables permettant de changer le profil de l'appareil suivant les utilisations. Cette liberté de conception, permet de créer différentes zones le long des vis : transport/apport des réactifs, mélange, réaction chimiques (Berzin *et al*., 2004 ; Xanthos, 1992). Les réactions ayant lieu à l'intérieur de l'extrudeur sont souvent très exothermiques du fait des frottements engendrés par le passage des produits et/ou par la réaction chimique elle-même. Une régulation de la température est possible avec certains modèles de paillasse mais à l'échelle industrielle cela est plus difficilement maîtrisable. C'est pourquoi, l'extrusion réactive devra dans ce cas être limitée aux systèmes pouvant être régulés thermiquement.

Un autre avantage de l'utilisation de l'extrusion réactive comme moyen d'extraction est la rapidité des opérations. Le temps de séjour dans un extrudeur est souvent assez court, de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes. Les réactions dont la cinétique est trop lente ne sont donc, a priori, pas de bonnes candidates pour l'extrusion réactive. Il faut cependant noter que les conditions imposées au système réactionnel lors de l'extrusion sont très particulières, et qu'une réaction nécessitant plusieurs heures en batch (cas de l'hydrolyse seule), peut parfois être conduite en seulement quelques minutes par extrusion réactive (Prat *et al*., 2002 ; Berzin *et al*., 2004).

II.4.1.3. Applications de l'extrusion réactive

L'extrusion réactive est un procédé qui va permettre le mélange intensif des réactifs avec le produit à traiter. Elle permet ainsi de réaliser des opérations difficiles à mener avec des réacteurs classiquement utilisés. Les nombreux avantages que présente l'extrudeur comme réacteur chimique ont été mis à profit notamment dans le domaine de la chimie pour contourner les problèmes rencontrés avec les procédés plus classiques : faibles rendements, réactions incomplètes, durées d'extractions trop importantes, ... Plusieurs travaux ont déjà montré les possibilités et les gains apportés par l'extrusion réactive (N'Diaye *et al.*, 1996 ; N'Diaye et Rigal, 2000). Ce sont les capacités de cisaillement de l'extrudeur qui vont faire la différence lors de l'utilisation d'un extrudeur bi-vis. La matière végétale va être totalement déstructurée et malaxée mécaniquement. Ce fractionnement de la matière végétale va pouvoir être encore amélioré par les traitements thermiques et/ou chimiques associés. De plus, il est possible de séparer deux fractions en sortie d'extrudeur : une fraction liquide devant contenir dans notre cas les composés d'intérêt et une fraction solide (résidus de matière). L'extrudeur permet donc d'opérer une extraction et la séparation solide/liquide de manière simultanée. Par ailleurs, le rendement obtenu par extrusion est souvent proche de celui obtenu en mode batch, avec

cependant un gain de temps et une économie d'eau non négligeable. Pour ce type de procédé, en vue de l'application recherchée, la concentration en réactif, la distribution des temps de séjour et l'énergie mécanique spécifique fournie à la matière sont les facteurs à déterminer pour mesurer l'efficacité de l'opération.

Les paramètres opératoires sont : la vitesse de rotation des vis, le débit et la température entre autres; et des variables géométriques telles que le profil des vis ou la géométrie de la filière pouvant influer sur la qualité de l'extrusion.

II.4.2. Matériels et méthodes

Cette partie du travail a été effectuée au laboratoire GEPEA, Saint-Nazaire dans le cadre du programme européen Biotecmar (*cf.* Introduction). Il s'agit de montrer les capacités de déstructuration de la biomasse algale par extrusion.

Cette étude devait permettre de tester les procédés d'extrusion dans deux buts distincts : dans un premier temps il s'agissait de voir si ce procédé pouvait s'intégrer en amont de l'extraction solide/liquide classique en tant qu'étape préparatoire, en permettant, grâce aux effets du cisaillement de rendre les composés recherchés plus disponibles. Dans un second temps il a été question de voir si ce procédé pouvait être employé en tant que procédé d'extraction en utilisant l'extrusion réactive. Deux systèmes d'extrudeurs bivis ont donc été testés ici. Cette étude a été menée sur les macrolagues brunes *Sargassum muticum* et *Ascophyllum nodosum* récoltées au Dellec (*cf*. chapitre I) dans le courant du mois de Janvier 2011.

II.4.2.1. Extrusion seule

Pour les essais sur la préparation de la biomasse avant extraction classique nous avons utilisé un mini extrudeur de paillasse BIVIS permettant de réaliser des essais à petite échelle (quelques dizaines ou centaines de grammes) (Figure II.25). Lors de cette expérience : plusieurs taux d'hydratation de la matière ont été testés pour jouer sur la viscosité (mesurée par la force du couple au sein de la machine). Ce degré d'hydratation est déterminé comme suit : 50% d'hydratation de la matière correspondent par exemple à l'ajout de 5 g d'eau à 5 g de matière algale lyophilisée (taux d'humidité en base sèche). La température ainsi que le degré d'hydratation de la biomasse lyophilisée ont également été examinés. Les différentes conditions testées sont résumées dans le tableau II.6. Des mesures de couple ont été effectuées lors de l'expérience grâce au système de mesure intégré à l'extrudeur et relié à un ordinateur permettant ainsi de visualiser en direct l'évolution du couple dans la machine. Ceci ayant pour but d'éviter une grande augmentation de celui-ci pouvant endommager le système de vis mais également de donner des informations sur l'état de la matière (résistance, ou colmatage).

NB : Définition du **couple** : **e**xprimé en Ncm (Newton par cm), le couple (M) est une grandeur mécanique qui permet de mesurer l'effort en rotation appliqué à un axe. Dans notre cas, plus celui-ci sera élevé plus cela signifiera que la force nécessaire à la rotation des vis dans l'extrudeuse sera grande. En d'autres termes plus le couple sera élevé plus la matière opposera de résistance lors de l'extrusion et plus la déstructuration de la matière devrait être importante. Inversement, lorsque la valeur du couple baisse cela signifie que la viscosité du mélange brassé par les vis diminue.

Figure II. 25. Extrudeur de paillasse BIVIS ; A) et B) Vue d'ensemble de l'appareil et du sytème de commande par ordinateur; C) Détail des deux vis co-rotatives et co-pénétrantes dans la filière.

Tableau II. 6. Détails des différentes conditions testées (CA1 pour *Ascophyllum nodosum* et CS1 à 7 pour *Sargassum muticum*).

	Algue testée	° d'hydratation (en % de la matière sèche)	Température (en °C)	Vitesse de rotation des vis (en tours.min^{-1})
CA1	*A. nodosum*	50	25	10
CS2	*S.muticum*	50	25	10
CS3		50	25	100
CS4		50	40	100
CS5		60	40	100
CS6		70	40	100
CS7		50	40	150

Afin de mesurer l'efficacité d'une telle étape en amont d'une extraction « classique », les résultats obtenus sur les extraits provenant de la biomasse extrudée seront comparés à ceux obtenus sur les extraits acquis dans les mêmes conditions d'extraction sur une biomasse non transformée. Les extractions sur biomasse transformée ou non sont réalisées de la manière suivante : 2 g de biomasse sèche (on tiendra compte du degré d'hydratation pour les échantillons extrudés) sont mis en suspension dans 200 mL d'un mélange acétone-eau 50 :50 durant 3 h à 40°C.

II.4.2.2. Extrusion réactive

Pour les essais d'extrusion réactive avec enzyme, nous avons utilisé l'extrudeur bi-vis co-rotatives et co-pénétrantes Clextral BC21 (Figure II.26). Un mélange enzymatique PROTEX (Genencor®Bacterial Alkaline Protease) a été utilisé. 50 g de ce mélange enzymatique sont dilués dans 2L d'eau distillée, le mélange est ensuite ajouté à 1 Kg de biomasse algale préalablement lyophilisée et réduite en poudre. La suspension obtenue est ensuite incubée 6-8 h à 40°C. Ce mélange est ensuite utilisé pour alimenter l'extrudeur bi-vis BC21. La biomasse récupérée à la sortie de l'appareil est gardée au frais (8°C) puis centrifugée afin de séparer les résidus du surnageant obtenu. Les tests ont été effectués uniquement sur le surnageant. Les résultats obtenus seront comparés à ceux obtenus sur une biomasse similaire lors d'une extraction solide/liquide « classique » (2 g de biomasse dans 200 mL d'un mélange acétone-eau 50 :50 (v/v), 3 h, 40°C sous agitation et à l'abri de la lumière).

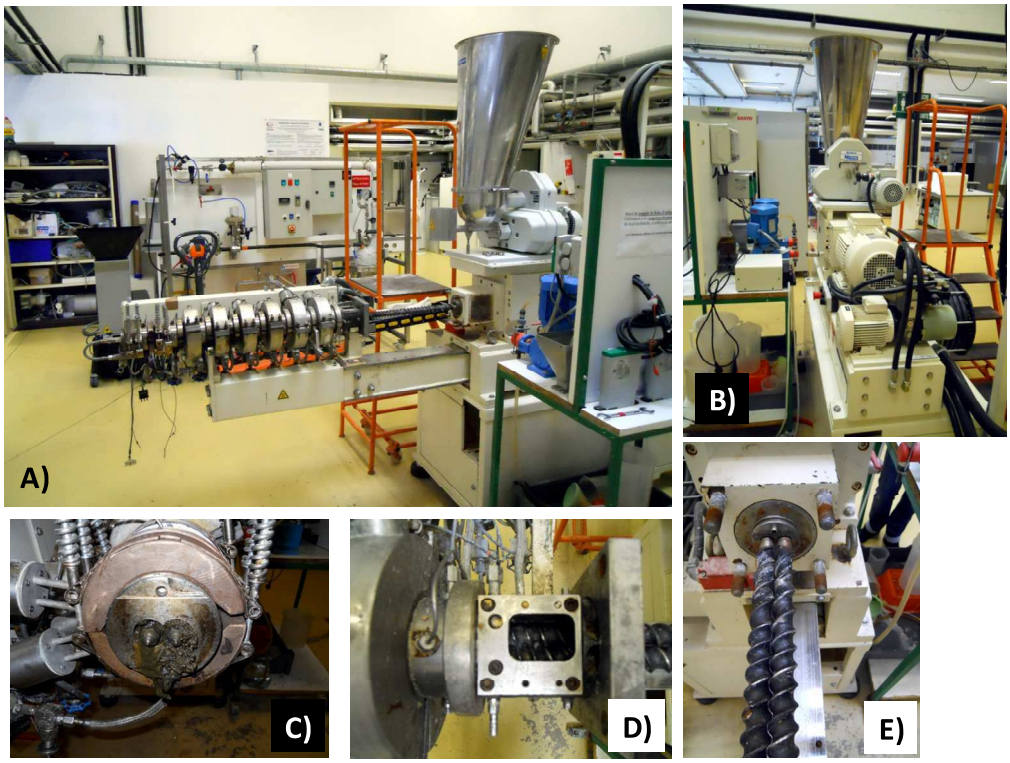


Figure II. 26. Extrudeur bi-vis co-rotatives et co-pénétrantes Clextral BC21 ; A) et B) Vue d'ensemble de l'appareil ; C) Détail de l'extrémité de la filière; D) détail de la trémie d'alimentation et E) détail des deux vis co-rotatives et co-pénétrantes.

Pour les deux tests : extrusion seule ou extrusion réactive, la mesure de la quantité de CP a été effectuée par des dosages de Folin-Ciocalteu (*cf.* chapitre I), les résultats seront exprimés à la fois par rapport au poids sec de la matière algale initiale (noté : %MSalgue) et par rapport au poids sec de la fraction obtenue (noté : %MSfraction).

II.4.3. Résultats

II.4.3.1. Extrusion seule

Les figures II.27 et II.28 permettent de comparer les quantités de composés phénoliques contenus dans des extraits obtenus, après une extraction solide/liquide "classique" avec utilisation d'un mélange acétone-eau 50 :50 (v/v), sur des matières de nature différentes: l'une non préalablement transformée (c'est-à-dire la poudre d'algue lyophilisée) et l'autre issue de l'extrusion. Plusieurs conditions ont été testées lors de l'extrusion. Sur la figure II.27, sont présentés les résultats obtenus pour les macroalgues *Sargassum muticum* et *Ascophyllum nodosum* lors d'une extraction classique (témoins notés Tse et TAe pour les témoins *S.muticum* et *A.nodosum* respectivement) ou après une extraction sur la matière extrudée (notée CS2 et CA1 pour *S.muticum* et *A.nodosum* respectivement) dans les conditions suivantes : vitesse de rotation de 10 t/min, température de 25°C et 50% hydratation de la matière. Pour *S.muticum*, on peut voir qu'il n'y a pas de différence significative au niveau de la quantité de composés extraits par rapport à la biomasse initiale (0.30 ± 0.07 et 0.21 ± 0.04 % du poids sec de l'algue pour le témoin sans extrusion (Tse) et la condition CS2, respectivement).

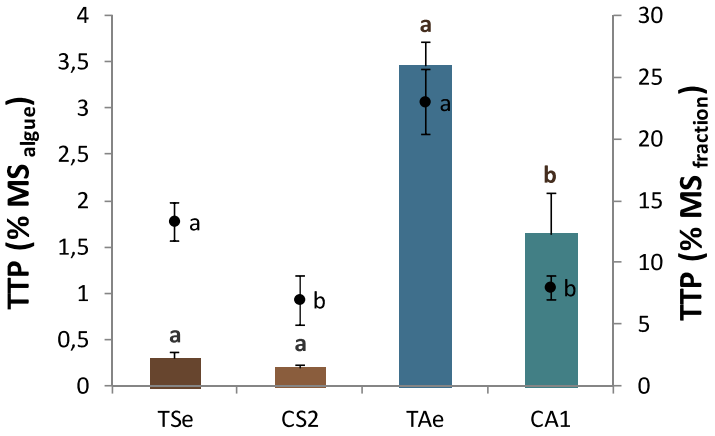


Figure II.27. Teneurs en composés phénoliques exprimées en %MS algue (histogrammes) ou en %MS fraction (points). TSe et TAe: Témoins d'extraction pour *S.muticum* et *A.nodosum* respectivement et CS2 et CA1 : conditions d'extrusion pour les macroalgues *S.muticum* et *A.nodosum*, respectivement. Les lettres correspondent aux résultats du test *a posteriori* (ANOVA, p< 0,05 ; Tukey).

Pour *A.nodosum*, on observe en revanche une diminution significative de la quantité de CP extraits sur la matière extrudée par rapport à la matière non transformée (3.47±0.25 et 1.63±0.45 % du poids sec de l'algue pour le témoin sans extrusion (TAe) et la condition CA1, respectivement). De la même manière, on peut voir que quelle que soit l'espèce considérée, le %

de CP contenu dans les extraits post extrusion est très inférieur à celui obtenu par une extraction sur matière non-extrudée (7.00 ± 2.00 contre 13.33 ± 1.53 et 8.00 ± 1.00 contre 23.00 ± 2.65 pour *S.muticum* et *A.nodosum* sur matière extrudée et non-extrudée, respectivement).

Sur la figure II.28, sont présentés les résultats obtenus pour la macroalgue *Sargassum muticum* lors d'une extraction classique (témoin noté Tse) ou après une extraction sur la matière extrudée (notées CS3 à CS7) obtenues dans différentes conditions (*cf.* Tableau II.6). On remarque que quel que soit l'état de la matière extrudée ou non et quelles que soient les conditions d'extrusions, la quantité de CP extraite à partir des algues est significativement identique (ANOVA, $p<0.05$; Tukey). En revanche, on observe bien un effet significatif (ANOVA, $p<0.05$; Tukey) de l'extrusion sur le % de CP contenus dans les fractions obtenues après extraction. Quelles que soient les conditions d'extrusion, le % de CP dans la fraction est diminué par rapport à une extraction sur matière non transformée. Certaines conditions semblent plus néfastes que d'autres. Par exemple la condition CS4 contient seulement 5.00 ± 1.00 % de CP pour 13.33 ± 1.53 % dans l'extrait sur matière non transformée. Les conditions semblant les moins néfastes sont les conditions CS3 et CS5 pour lesquelles on obtient respectivement 10.67 ± 0.58 et 10.33 ± 1.53 % de CP dans les fractions.

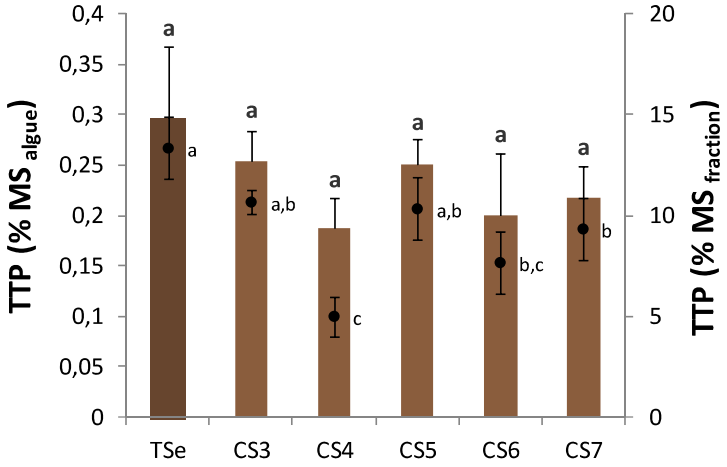


Figure II. 28. Teneur en composés phénoliques exprimés en %MS algue (histogrammes) ou en %MS fraction (points). TSe : Témoin d'extraction pour *S.muticum* et CS3 à CS7 : conditions d'extrusion pour la macroalgue *S.muticum*. Les lettres correspondent aux résultats du test *a posteriori* (ANOVA, p< 0.05 ; Tukey).

Des mesures de couple ont été effectuées durant les différentes conditions d'extrusion. Les données obtenues sont présentées sur la figure II.29. Seule la condition CS4 permet l'obtention d'une valeur de couple élevée mais également assez stable sur la durée, le couple diminue progressivement et moins rapidement que pour CS7. Par ailleurs le couple obtenu lors de l'expérience CS5 diminue également de façon progressive, ce qui signifie que la matière devient de moins en moins visqueuse au cours du temps, la déstructuration est donc efficace.

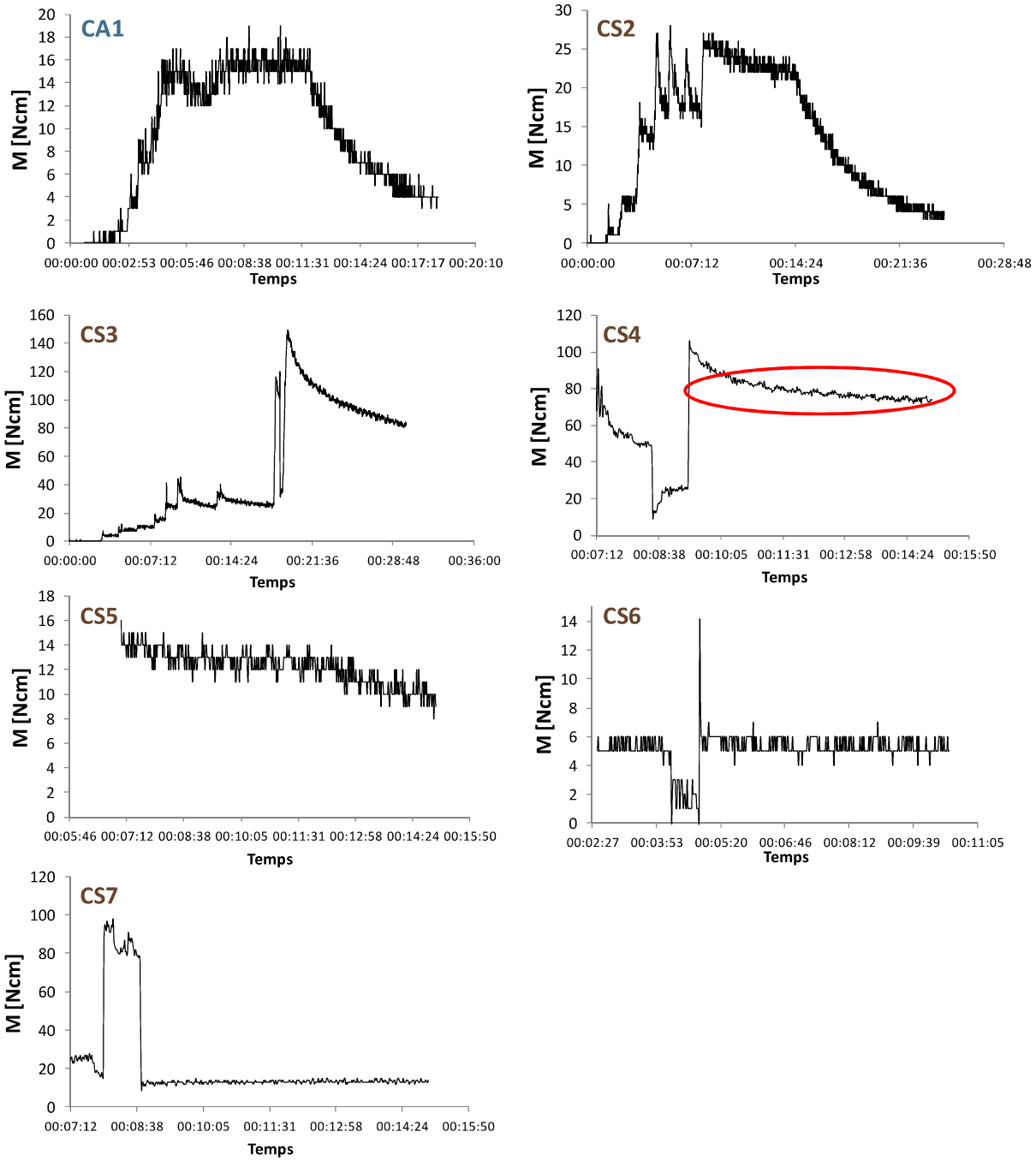


Figure II.29. Mesure des valeurs de couple au cours des expériences d'extrusion sur le mini-extrudeur bi-vis. CA1 : condition 1 pour *A.nodosum* ; CS1,2,3,4,5,6 et7 pour *S.muticum*.

Les tests statistiques montrent que les paramètres d'extrusion n'ont pas d'effet significatif sur la quantité de composés phénoliques extraits à partir des algues. En revanche, ces mêmes paramètres ont tous un effet significatif sur le pourcentage de composés phénoliques dans les fractions obtenues (Tableau II.7). Ainsi,

1) **plus la température est faible**, plus la concentration en CP en pourcentage du poids de la fraction est importante (5.00 ± 1.00 et 10.67 ± 0.58 pour les conditions CS4 (50°C) et CS3 (25°C), respectivement) ;

2) un **degré d'hydratation de 60%** semble être le plus efficace (5.00 ± 1.00, 7.67 ± 1.53 et 10.33 ± 1.53 pour les conditions CS4 (50%), CS6 (70%) et CS5 (60%), respectivement) ;

3) **plus la vitesse de rotation augmente** plus la concentration en CP en pourcentage du poids de la fraction est importante (7.00 ± 2.00 et 10.67 ± 0.58 pour les conditions CS2 (10 tours.min^{-1}) et CS3 (100 tours.min^{-1}), respectivement).

Tableau II. 7. Résultats des tests ANOVA à un facteur, avec comme variables les teneurs totales en phlorotannins (TTP) exprimées soit en % du poids sec de l'algue soit en % du poids sec de la fraction. Les facteurs de variation étudiés sont la température, le degré d'hydratation ainsi que la vitesse de rotation des vis.

Variable	Test statistique		Facteurs fixes		
			Température	° d'hydratation	Vitesse de rotation
TTP	One Way ANOVA	df	1	2	1
(%MS_{algue})		F	7.143	1.813	3.015
	Tukey p<0.05	*p*	0.055	0.242	0.157
TTP	One Way ANOVA	df	1	2	1
(%$MS_{fraction}$)		F	72.250	11.294	9.308
	Tukey p<0.05	*p*	0.001	0.009	0.038
			CS3>CS4	**CS5≥CS6≥CS4**	**CS3>CS2**

II.4.3.2. Extrusion réactive

La figure II.30 présente les résultats obtenus après dosage des composés phénoliques contenus dans le surnageant de l'extrait obtenu après extrusion réactive. La quantité obtenue dans celui-ci exprimée en % du poids de l'algue ou de la fraction obtenue est comparé à la quantité obtenue après une extraction « classique » solide/liquide en utilisant un mélange acétone-eau 50 :50 (v/v). La quantité de CP extraite par rapport à la matière algale utilisée lors de l'extrusion réactive est presque quatre fois inférieure à la quantité obtenue par extraction classique (0.02 ± 0.01 et 0.07 ± 0.02 % du poids sec de l'algue pour l'extraction après extrusion ou sans étape préalable, respectivement). On observe la même tendance si on s'intéresse au % de CP obtenus dans le surnageant issu de l'extrusion enzymatique (7.67 ± 0.58 et 3.33 ± 1.53 % du poids sec de la fraction pour l'extraction après extrusion ou sans étape préalable, respectivement).

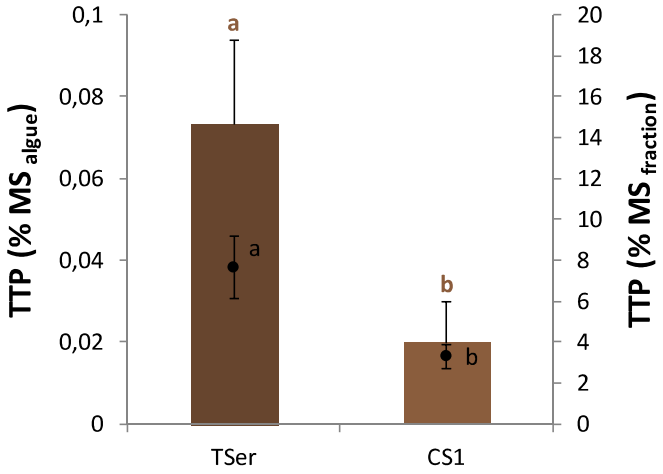


Figure II.30. Teneur en composés phénoliques exprimés en %MS algue (histogrammes) ou en %MS fraction (points). TSer : Témoin d'extraction, CS1 : condition 1 pour la macroalgue *S.muticum*. Les lettres correspondent aux résultats du test *a posteriori* (ANOVA, p< 0.05 ; Tukey).

II.4.4. Discussion

Les procédés d'extrusion testés n'ont pas permis d'obtenir un extrait contenant davantage de composés phénoliques que l'extraction Solide/Liquide classique. Il faut cependant rappeler que la biomasse utilisée pour ces tests a été récoltée en Janvier pour *Sargassum muticum* ce qui explique les faibles quantités extraites par l'un ou l'autre des procédés. En revanche, cela n'explique pas les résultats obtenus pour *A.nodosum* pour laquelle la quantité de composés extraite est nettement moins importante sur la biomasse extrudée en amont. L'extrusion permet d'obtenir une sorte de pâte assez dense est très peu malléable, cet aspect de la matière obtenue pourrait expliquer les faibles rendements d'extraction, en effet il se pourrait que le solvant d'extraction ne puisse pas diffuser au cœur de cette matière. Il faudrait donc probablement augmenter le degré d'hydratation de la matière afin d'obtenir un produit moins compact ou encore utiliser ce procédé en combinaison avec un solvant d'extraction tel qu'un mélange hydro-alcoolique afin de ne récupérer que la partie liquide en sortie d'extrudeur. D'autre part, l'utilisation de la mini extrudeuse a permis de réaliser des mesures de viscosité et de résistance de la matière. On a ainsi pu vérifier les effets du cisaillement intense sur la déstructuration des tissus algaux.

Pour la partie du travail concernant l'extrusion réactive, le mélange enzymatique utilisé seul ou en combinaison avec l'extrusion n'a pas permis une bonne extraction des composés phénoliques. La quantité obtenue reste inférieure à celle obtenue classiquement par extraction solide-liquide classique. Un témoin d'hydrolyse enzymatique seul aurait également été nécessaire afin de voir si, sans l'intervention de l'extrusion, la quantité de composés extraite aurait été supérieure. Ces résultats proviennent là encore certainement du fait que la matière algale initiale contenait peu de composés phénoliques. On peut tout de même faire l'hypothèse que l'enzyme utilisée ne permet pas de libérer les composés souhaités, ou ne convient tout simplement pas à la biomasse utilisée. En effet nous avons testé un mélange de protéase

(PROTEX) lors de cette étude. Ces protéases (ou peptidases ou enzymes protéolytiques) sont des enzymes qui scindent les liaisons peptidiques des protéines. Or il existe également des carbohydrases capables de catalyser, en présence d'eau, la rupture de carbohydrate en glucides simples. Cependant, des résultats obtenus sur la même biomasse récoltée cette fois en juillet ont montré que ni les protéases, ni les carbohydrases testées ne permettaient d'augmenter le rendement d'extraction des composés phénoliques à partir de *Sargassum muticum* (Hardouin *et al*., 2013 ; en Annexe n°2). Le procédé d'extraction par hydrolyse enzymatique est pourtant de plus en plus utilisé, depuis quelques années, pour l'extraction de composés actifs à partir de produits naturels (Samarakoon et Jeon, 2012; Wijesinghe et Jeon, 2012b). Par ailleurs, l'action de l'enzyme étant très dépendante de la température, il se peut également que la température atteinte lors de l'extrusion n'a pas été suffisante.

Malgré cela, une forte déstructuration de la matière est constatée en sortie d'extrudeuse et montre que la technique pourrait être envisagée en tant que traitement préparatoire avant extraction à condition, comme pour la mini-extrudeuse, de prêter attention au degré d'hydratation de la matière notamment.

II.4.5.Conclusion

Ces premiers résultats montrent que les deux procédés testés : extrusion et hydrolyse enzymatique n'apportent pas ou très peu d'avantages par rapport à une extraction solide/liquide classique dans les conditions choisies. Il faudrait poursuivre les tests en suivant un plan d'expérience permettant de balayer toutes les combinaisons de paramètres (degré d'hydratation, température, vitesse de rotation des vis) afin de conclure quant à l'efficacité du procédé pour l'extraction des CP.

II.5. Conclusion sur les procédés d'amélioration de l'extraction des composés phénoliques

Ce chapitre devait nous permettre de faire un point sur les procédés d'extraction existant pour l'extraction de biomolécules d'intérêt. Notre but était de trouver parmi eux le ou les procédés les plus adaptés à l'extraction des composés phénoliques recherchés. Dans un premier temps nous avons vu que l'extraction solide-liquide classiquement utilisée en routine dans les laboratoires reste un procédé simple, rapide à mettre en place et permettant d'obtenir des fractions aux activités comparables à celles des produits antioxydants disponibles sur le marché en contrôlant rigoureusement les paramètres pouvant influencer la qualité d'une extraction (nature de la matière première, nature du solvant, la durée et la température d'extraction). Les **conditions d'extraction solide/liquide permettant d'obtenir le meilleur rendement d'extraction des composés recherchés étaient : un mélange Acétone-Eau 50 :50, 40°C, 2h**. Cependant, l'extraction solide-liquide reste un procédé relativement lent ; les durées d'extraction étant souvent de l'ordre de plusieurs heures. De plus, cette technique, pour qu'elle soit la plus efficace, nécessite le plus souvent l'emploi de solvants toxiques, en grande quantité, ce qui rend

les extraits inappropriés pour une utilisation en alimentaire ou cosmétique. Enfin, certains solvants organiques peuvent dénaturer les autres composés présents, rendant impossible la valorisation totale de l'algue.

Nous avons vu qu'il existait néanmoins des procédés plus « éco-respectueux », déjà utilisés pour l'extraction de biomolécules variées à partir des algues. En particulier l'extraction par fluide supercritique (SFE), l'extraction par liquide pressurisé (PLE) ou encore l'extraction de partage centrifuge (PCE) qui pourraient être utilisés pour les composés phénoliques. L'avantage majeur de ces procédés est l'utilisation de solvants non toxiques ou des faibles volumes de solvant et des temps d'extractions plus courts que d'autres procédés. Ils permettent souvent de meilleurs rendements d'extraction. Notre étude a démontré pour la première fois l'intérêt d'utiliser des procédés alternatifs pour l'extraction verte et sans solvants toxiques de CP à partir d'algues brunes sans les dénaturer. Plusieurs solvants et procédés ont été testés ici afin d'obtenir une fraction de CP actifs à partir d'échantillons de *S.muticum*. L'EPC et la PLE en particulier, semblent être prometteuses pour l'extraction de polyphénols aux activités anti-radicalaires intéressantes. L'EPC permet un grand rendement d'extraction ainsi que l'obtention d'une fraction active concentrée en CP mais nécessite l'emploi de solvants encore toxiques. **L'extraction par fluides pressurisés (PLE) employée avec un mélange Ethanol-Eau** permet l'extraction de composés actifs avec une haute efficacité et **reste également la méthode la plus « verte » et répond donc potentiellement aux normes européennes pour une future valorisation de ces extraits**.

Les premières investigations effectuées sur les deux derniers procédés testés : extrusion et hydrolyse enzymatique nous apprennent que ceux-ci ne semblent pas convenir à l'extraction de composés phénoliques dans les conditions testées. Ils n'apportent pas ou très peu d'avantages par rapport à une extraction solide/liquide classique. Il faudrait poursuivre les investigations en suivant un plan d'expérience pour tester toutes les combinaisons de paramètres (degré d'hydratation, température, vitesse de rotation des vis) afin de s'assurer de l'inefficacité du procédé pour l'extraction des CP.

Enfin, nous avons vu qu'il n'existe pas de protocole standard pour l'extraction des composés phénoliques. En effet, il faut adapter le protocole à l'espèce choisie, la qualité de l'extraction en étant hautement dépendante.

Ce Chapitre II nous permet de sélectionner *Sargassum muticum* comme étant une espèce intéressante du point de vue de la quantité et de la qualité des phlorotannins qu'elle produit. Cette espèce est également disponible en grande quantité à partir du printemps et jusqu'à la fin de l'été sur l'estran, ce qui la rend plus accessible par rapport à l'espèce P*ylaiella littoralis* présente en très faible quantité. *Sargassum muticum* produit par ailleurs de plus petits composés que l'espèce *Ascophyllum nodosum* (Le Lann, 2009 ; Breton *et al*., 2011). Ces composés phénoliques de petite taille ou oligophénols sont connus pour leurs nombreuses activités biologiques. De plus, comme vu au Chapitre I, *S. muticum* est une espèce d'algue brune introduite dans diverses régions du Monde. Il est donc intéressant dans une dynamique de

gestion des ressources marines d'essayer de trouver un intérêt à cette espèce invasive non native de nos côtes. Le projet BIOTECMAR nous ayant permis d'échantillonner cette espèce le long d'un gradient latitudinal Nord-Sud sur les côtes atlantiques européennes, **le chapitre suivant sera consacré à l'étude de la variabilité chimique chez cette espèce le long de ce gradient.**

CHAPITRE III

Etude de la variabilité chimique de Sargassum muticum en Europe

III.1. Introduction

Le chapitre II nous a permis de sélectionner *Sargassum muticum* comme une espèce intéressante du point de vue de sa teneur en composés phénoliques à activité antiradicalaire importante. Comme nous l'avons vu au chapitre I, *Sargassum muticum* présente une large distribution le long des côtes atlantiques ; on la rencontre du Maroc jusqu'en Norvège (Plouguerné et al. 2006; Kraan 2008; Engelen et al. 2008; Incera et al. 2009; Olabarria et al. 2009; Le Lann et al. 2012a). Nous avons étudié la variabilité de la composition biochimique de l'espèce en Europe afin de comprendre, sur des populations naturelles, quels pouvaient être les facteurs de l'environnement responsables de cette variabilité. Nous avons souhaité étudier la variabilité des macromolécules (protéines, lipides, glucides) de *S. muticum* prélevé dans des populations naturelles le long d'un gradient latitudinal, du Portugal jusqu'à la Norvège. Pour cela, au printemps 2011, ont été récoltées trois populations dans chaque pays visité (Portugal, Espagne, Irlande France et Norvège) soit quinze populations au total.

Dans ces différents pays échantillonnés, l'algue a du s'adapter ou tout du moins s'acclimater aux différentes conditions environnementales régnant dans ces milieux. L'environnement marin est en effet caractérisé par une grande hétérogénéité des paramètres physico-chimiques le définissant (*cf.* chapitre I). Son état va évoluer au gré des fluctuations naturelles et/ou anthropiques jouant sur l'intensité lumineuse, la température, le pH et la salinité de l'eau, la disponibilité en nutriments, la présence de polluants ou encore les interactions biotiques. La variabilité des différents compartiments biochimiques en fonction des paramètres environnementaux sera donc étudiée ici et comparée aux données présentées dans la littérature.

L'étude et la quantification des macromolécules présentes chez *Sargassum muticum* (lipides, protéines ou glucides) permet d'obtenir une information sur l'état physiologique de l'organisme étudié, reflétant par exemple les changements métaboliques en réponse à un stress environnemental donné. Le criblage fonctionnel peut être réalisé avec les méthodes classiques de dosage des macromolécules totales (lipides, protéines, glucides), mais de telles approches impliquent souvent des étapes fastidieuses d'extraction ou de marquage des macromolécules d'intérêt. Aussi dans ce chapitre nous traiterons, dans un premier paragraphe de la comparaison de deux techniques analytiques non invasives : la RMN HR-MAS et la spectroscopie Infrarouge (IR) ; pour la semi-quantification de macromolécules dans les thalles provenant des différents pays et cela dans deux buts majeurs :

1) Ces techniques permettent d'obtenir une empreinte chimique de l'algue sur laquelle on peut comparer les quantités des différentes macromolécules visibles dans l'échantillon (lipides, protéines, glucides). De telles approches pourraient permettre de s'affranchir, lorsqu'une comparaison rapide du contenu macromoléculaire est souhaitée, des étapes fastidieuses d'extraction, de marquage ou de dosage chimique des macromolécules d'intérêt.

2) D'autre part, ces techniques permettent de mettre en avant de potentiels marqueurs biochimiques intraspécifiques, présents uniquement dans certaines conditions et pouvant provenir d'une simple régulation ou encore d'une adaptation de l'espèce à son environnement.

De tels marqueurs sont particulièrement difficiles à mettre en avant par des techniques de dosages classiques nécessitant de savoir au préalable dans quelle direction chercher.

Dans un deuxième paragraphe, nous doserons de manière plus précise les différentes macromolécules citées plus haut. Les teneurs en différents acides gras et pigments contenus dans les thalles seront également mesurées ceci dans le but de compléter l'analyse effectuée au premier paragraphe.

III.2. Comparaison de deux techniques pour la discrimination des échantillons de S.muticum d'après leur provenance géographique: IR/RMN HR-MAS

III.2.1.Introduction

Dans ce paragraphe, sont présentées et comparées les deux techniques analytiques utilisées, pour l'évaluation du contenu macromoléculaire chez des individus de *Sargassum muticum* provenant d'un gradient européen latitudinal Nord-Sud.

III.2.1.1. But de l'étude

Dans un premier temps, au lieu d'analyser la composition chimique de chaque métabolite primaire, nous avons choisi d'utiliser au lieu de mener une démarche invasive, c'est-à-dire d'isolement de chaque compartiment biochimique de l'algue (protéines, lipides, glucides), nous avons choisi une démarche utilisant des techniques de mesures innovantes permettant d'analyser à la fois les trois compartiments sur un même profil chimique, et ainsi de dégager les différences majeures entre les profils chimiques d'algues d'une même espèce provenant de lieux aux conditions environnementales très différentes.

La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourrier (IRTF ou FT-IR pour « Fourrier Transform InfraRed spectroscopy ») ou encore de la Résonance Magnétique Nucléaire Haute résolution à l'Angle Magique (RMN HR-MAS) permettent, en effet, sans extraction préalable, la semi-quantification (proportion de molécules les unes par rapport aux autres) simultanée et rapide des macromolécules. Ces deux techniques se sont avérées très utiles pour différencier des espèces (Helm *et al*., 1991 ; Naumann *et al*., 1991 ; Kirschner *et al*., 2001 ; Rebuffo *et al*., 2006 ; Gudlavalleti *et al*., 2006 ; Li, 2006 ; Le Lann *et al*., 2008 ; Jégou *et al*., 2010) animales ou végétales entre elles de façon rapide et efficace. Dans notre cas, il s'agissait d'apprécier l'efficacité de ces techniques pour différencier des populations d'une même espèce ; populations distribuées le long du gradient latitudinal.

Ce volet nous permet de répondre à la question suivante :

Comment varie le contenu en macromolécules dans les thalles de *Sargassum muticum* suivant les différents Pays étudiés et peut-on utiliser des techniques analytiques non invasives telles que la HR-MAS ou la spectroscopie Infra-rouge afin de mettre en évidence ces variations ?

III.2.1.2. Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourrier (IRTF)

a) Principe général

La spectroscopie infrarouge mesure les vibrations intramoléculaires au sein de molécules, sous forme solide, liquide ou gazeuse, excitées par un rayonnement infrarouge. Les longueurs d'onde vibrationnelles étant spécifiques à chaque classe de molécules, un spectre permet l'identification des composés constituant un échantillon organique par exemple. Ces fréquences de résonance dépendent de la forme des surfaces d'énergie potentielle, des masses atomiques et du couplage vibronique associé. Afin qu'un mode vibrationnel dans une molécule soit actif dans l'infrarouge, il doit être associé à des modifications du dipôle permanent (c'est à dire à des modifications de la symétrie dans la distribution des charges électroniques au sein d'une molécule encore appelé moment dipolaire). Néanmoins, les fréquences de résonance peuvent être liées à la force de la liaison et aux masses atomiques de terminaison. La fréquence des vibrations peut donc être associée à un type de liaison particulière. Le rayonnement infrarouge moyen, allant de 4000 à 400 cm^{-1} environ peut être utilisé pour étudier les vibrations fondamentales.

b) Mesure et détermination de la structure

Tout d'abord, un échantillon de faible épaisseur doit être préparé afin qu'il puisse être traversé par un rayonnement infrarouge. L'examen de la lumière transmise indique la quantité d'énergie absorbée pour chaque longueur d'onde. Cette mesure peut être réalisée de différentes manières : en utilisant un faisceau monochromatique, en modifiant la longueur d'onde dans le temps, ou encore en utilisant un instrument à transformée de Fourier afin de prendre en compte toutes les mesures d'onde simultanément. Il est alors possible de produire des spectres en absorbance ou en transmittance, et d'indiquer les longueurs d'onde d'absorption. Après traitement du spectre par transformée de Fourier, l'analyse de ces caractéristiques donne des indications sur la structure moléculaire de l'échantillon. Dans certains cas, il est possible, de comparer le spectre obtenu avec des bases de données, permettant ainsi l'identification des molécules présentes dans le composé. Cette technique fonctionne surtout sur les échantillons présentant des liaisons covalentes. Des échantillons présentant un haut degré de pureté permettent l'obtention de spectres simples quand les structures moléculaires plus complexes conduisent à plus de bandes d'absorption et donc à des spectres plus complexes. Cette technique peut cependant être utilisée pour la caractérisation de mélanges très complexes. Un des intérêts de cette méthode dans notre champ d'application réside dans la caractérisation des molécules organiques, peu accessible par d'autres approches.

NB : L'intensité des bandes composant un spectre infrarouge est proportionnelle à l'abondance des groupements chimiques dans l'échantillon analysé (loi de Beer-Lambert). **L'intensité de la bande est liée** à la variation du moment dipolaire et **à la concentration**. Il est ainsi possible d'obtenir, dans certains cas, **une information quantitative ou du moins, semi-quantitative**. De nombreuses approches sont actuellement développées pour l'estimation sur cellule entière de l'abondance relative (Dean *et al*., 2010) ou absolue des métabolites intracellulaires (Wagner *et al*., 2010). La spectrométrie infrarouge exprime ici tout son potentiel analytique par rapport aux techniques classiques de dosage, puisqu'elle est **non invasive, rapide** et ne nécessite que **quelques microgrammes ou nanogrammes** de poudre pour son protocole expérimental.

c) Informations portées par un spectre IR enregistré sur une cellule entière

Si on ne tient pas compte de l'échelle de résolution des acquisitions, la plupart des bandes présentes sur un spectre infrarouge peut être assignée à des modes de vibration particuliers. Certains spectres peuvent être considérés comme une signature chimique des principales familles de macromolécules (Coates, 2006). On retrouve ainsi sur un spectre IR des zones caractéristiques de fonctions chimiques. Par exemple, les bandes d'absorption des amides I et II des protéines sont reconnaissables à, respectivement, ≈1656 cm^{-1} et ≈1545 cm^{-1}, celle des lipides (à ≈2900 cm^{-1}), et enfin entre 900 et 1200 cm^{-1} de nombreuses caractéristiques des carbohydrates ou saccharides sont détectées en fonction des espèces (Mecozzi *et al*., 2011) (Figure III.1).

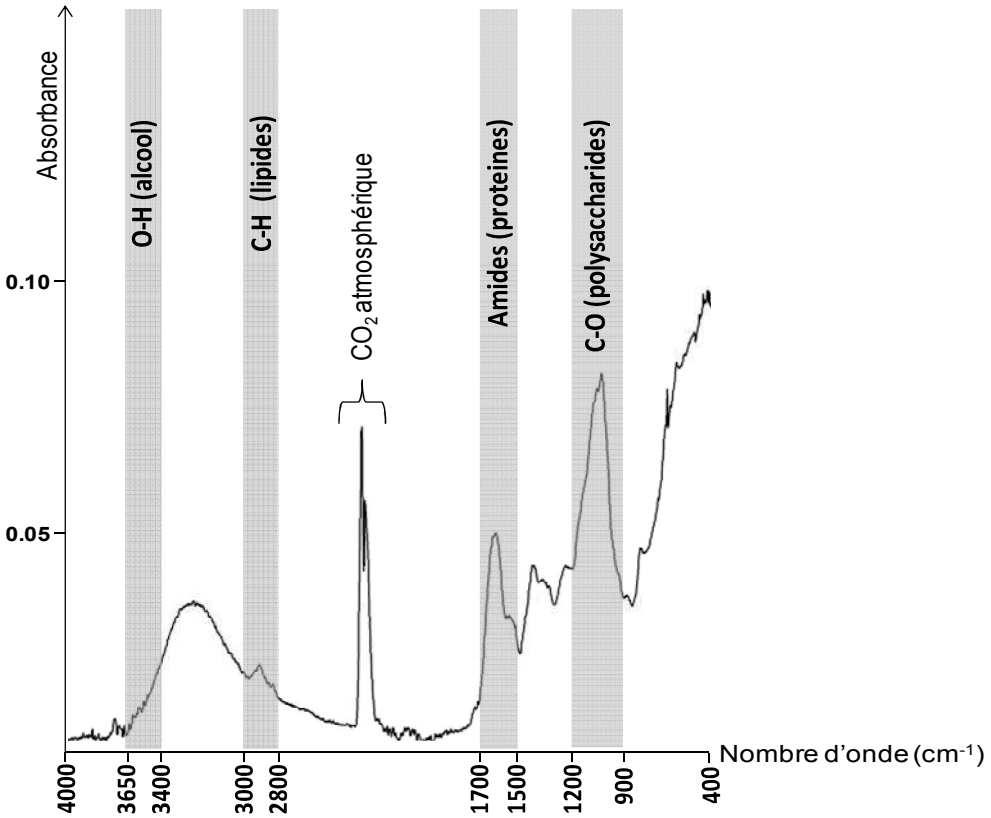


Figure III. 1. Spectre infrarouge enregistré sur un échantillon de poudre de *S. muticum* provenant du site La pointe du diable (France). Les principales bandes de vibration d'intérêt sont assignées sur le spectre.

Ces données spectrales renseignent immédiatement sur la présence ou l'absence (de détection) d'une famille de macromolécules par rapport à une autre pour un échantillon donné. Il est également possible de comparer les abondances relatives de ces molécules dès lors que la concentration de l'une d'entre elles **ne varie pas ou peu** au cours du processus étudié (Dean *et al*., 2010).

III.2.1.3. Résonance Magnétique Nucléaire HR-MAS

La RMN du solide, ou RMN HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning), technique empruntée à la ^{1}H-RMN (ou RMN du proton) (voir chapitre I) des solutions a été amorcée en 1959 par Raymond Andrew. Cette technique, d'une résolution proche voire supérieure à celle rencontrée en RMN haute résolution des solutions, est basée sur la rotation de l'échantillon suivant un axe orienté à l'angle magique (54,7° par rapport à la direction du champ magnétique B0) à haute fréquence (de l'ordre du kHz). La RMN HR-MAS (ou RMN *in vivo*) permet d'obtenir des spectres à partir d'échantillons hétérogènes, solides ou liquides mais généralement non transformés (échantillons de tissus frais ou lyophilisés).

La sonde HR-MAS permet par exemple d'obtenir directement un profil ^{1}H RMN d'échantillons algaux lyophilisés par exemple, sans aucune étape d'extraction. Cette méthode permet d'obtenir une empreinte chimique de l'échantillon testé et donc différencier des échantillons entre eux ou encore de confirmer l'identité d'un échantillon par exemple (application en agroalimentaire – Shintu et Caldarelli, 2006 ; Shintu *et al.*, 2007). La Résonance Magnétique Nucléaire ^{1}H HR-MAS est la première méthode employée en ce sens. Elle permet de visualiser le contenu d'échantillons directement à partir de tissus biologiques (Desmoulins *et al*., 2007). Ainsi, la RMN HR-MAS ne nécessite pas de manipulation particulière des échantillons avant leur analyse. Cette technique à l'avantage, par rapport à la RMN ^{1}H « classique », d'apporter une grande visibilité de l'échantillon. En effet, une grande partie des métabolites cellulaires sont visibles en RMN HR-MAS, contrairement à la ^{1}H RMN sur échantillons liquides pour laquelle seules les molécules solubilisées dans le solvant utilisé sont détectables. En revanche, cette technique a tout de même ses limites, les molécules immobilisées dans l'échantillon, comme par exemple celles constituant les parois cellulaires, ne seront pas détectables.

III.2.2. Matériels et méthodes

III.2.2.1. Echantillonnage et préparation des échantillons

Les thalles de *Sargassum muticum* utilisés pour cette étude, ont été récoltés entre les mois de Mars et Mai 2011 dans trois sites provenant de cinq pays le long d'un gradient latitudinal Sud-Nord en Europe (*cf.* Chapitre I). Les échantillons ont été collectés au Portugal, en Espagne, France, Irlande et également en Norvège (voir Introduction générale). La période d'échantillonnage a été choisie en fonction du stade physiologique de l'algue dans chacun des pays. En effet, durant la période choisie, *S. muticum* est immature dans chacun des pays échantillonnés. Seules les parties apicales et médianes du thalle ont été retenues, le crampon a été laissé en place afin de permettre la repousse et ainsi de minimiser l'impact de la récolte sur les populations. Immédiatement après récolte, les algues récoltées ont été débarrassées des épiphytes pouvant les recouvrir, rincées à l'eau de mer filtrée puis à l'eau distillée afin

d'enlever les résidus de sel ou de sédiments. Elles ont ensuite été essuyées, découpées en petits fragments, lyophilisées et finalement réduites en poudre. Par souci d'obtenir une poudre homogène au niveau de la taille des particules la composant, celle-ci est tamisée à 250 µm.

III.2.2.2. Analyses en spectroscopie RMN HR-MAS

Dans notre étude, les analyses de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été réalisées à l'aide d'une sonde HR-MAS $^{1}H/ ^{31}P$ sur le spectromètre BRUKER DRX Advance 500 (500 MHz) à 25°C au service commun de RMN-RPE de l'UBO avec l'aimable collaboration de Mme Nelly Kervarec. Les échantillons d'algues lyophilisés (5 mg environ) ont été placés dans un rotor à 5000 Hz de rotation avec de l'eau deutérée (D_20).

Cette méthode consiste à obtenir, via la technique de RMN *in vivo*, une empreinte chimique de l'échantillon testé. Il s'agissait de savoir, si les algues provenant d'un même pays avait une « carte d'identité chimique» propre ou si au contraire peu de différences étaient visibles entre des échantillons provenant de sites et de pays différents. Les spectres obtenus ont été comparés pour chaque échantillon et les données spectrales ont été analysées via des analyses de regroupement (cluster). La démarche fut la suivante. Dans un premier temps, nous avons réalisé une matrice présence/absence pour chaque signal observé sur le spectre; au final, cela se traduit par un tableau à 15 colonnes (15 échantillons) et à plus de 1000 lignes recensant l'ensemble des signaux présents sur chaque spectre. Les signaux ont été distingués les uns des autres sur toute la plage de déplacements chimiques (entre 0 et 7 ppm). De cette façon, nous avons pu mettre en évidence des signaux originaux, et d'autres qui, au contraire, étaient récurrents dans les échantillons.

Enfin, afin de valider cette méthode pour la discrimination d'échantillons d'origine géographiquement différente, des tests ont été réalisés en aveugle sur des spectres pris au hasard afin de voir si, par le biais d'analyses statistiques (analyse de clusters), ces échantillons étaient notés comme appartenant au bon groupe.

III.2.2.3. Analyses en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les études en spectroscopie infrarouge ont été réalisées au GEPEA (St Nazaire) avec la collaboration de Laurent Vandanjon et Olivier Gonçalves dans le cadre du programme COSELMAR.

L'acquisition des spectres par le biais d'un cristal de diamant à simple réflexion du dispositif à réflexion totale atténuée (communément appelée ATR de l'anglais « Attenuated Total Reflectance ») a été effectuée sur un microscope FT-IR à simple raie (tensor 27, Bruker Gmbh) équipé d'un détecteur RT-DLaTGS. L'acquisition, le contrôle et l'évaluation des données spectrales sont réalisés grâce au logiciel OPUS/LAB version 7.0.122. Les mesures sont effectuées en mode réflexion et les paramètres d'acquisition sont les suivants : 32 scans, une résolution de 1 cm^{-1} et une ouverture de 6 mm. La fonction d'apodisation utilisée est celle Blackman-Harris (à trois termes). Ce matériel nous a permis d'utiliser seulement quelques milligrammes de poudre d'algue lyophilisée qui ont été placés directement sous le détecteur. L'acquisition de chacun des spectres (3 par échantillon) s'est faite dans des conditions stables

dans la région spectrale allant de 400 à 4000 cm^{-1}. Après avoir été traités par Transformée de Fourier, tous les spectres enregistrés sont analysés par groupe (réplicat) afin de compenser les effets de ligne de base ainsi que le rapport CO_2/ H_2O pour être finalement lissés grâce à l'outil de correction intégré au logiciel OPUS.

Ainsi, les réplicats des spectres sont moyennés afin de générer un nouveau spectre, ce qui signifie que l'intensité du nouveau spectre ainsi généré résulte de la moyenne des intensités des trois spectres originaux. Après quoi, les données ont été traitées statistiquement sous forme d'analyse de cluster utilisant l'algorithme de Ward permettant de calculer les distances entre deux classes (ici entre deux spectres moyennés).

III.2.3.Résultats et discussion

Les résultats ainsi que leur discussion sur la comparaison des deux méthodes RMN HR-MAS et Spectroscopie FT-IR, basées sur l'analyse d'empreintes chimiques pour la différenciation rapide d'échantillons provenant de cinq pays le long des côtes atlantiques, ont fait l'objet d'une publication (short communication) dans la revue «*Talanta* » sous la référence suivante :

"Rapid geographical differentiation of the European spread brown macroalga *Sargassum muticum* using HRMAS NMR and Fourier-Transform Infrared spectroscopy"

Tanniou Anaëlle, Vandanjon Laurent, Gonçalves Olivier, Kervarec Nelly, Stiger-Pouvreau Valérie.

DOI 10.1016/j.talanta.2014.09.002

Des profils chimiques globaux ont été obtenus à partir de morceaux de thalles de *Sargassum muticum*, analysés par RMN HR-MAS et spectroscopie FT-IR. Il s'agissait de pouvoir différencier, par leur provenance géographique, les algues provenant de trois sites de cinq pays différents, le long d'un gradient latitudinal européen, au travers de la comparaison de leurs profils chimiques, obtenus par ces deux techniques (Figure III.2). Les deux techniques, bien que n'apportant pas tout à fait le même type d'information, ont permis de différencier de façon nette et efficace les différentes provenances des *S. muticum*, permettant même des regroupements statistiques très pointus puisqu'il a été possible de différencier les algues provenant de sites différents au sein d'un même pays. Par ailleurs, la spectroscopie FT-IR s'avère particulièrement intéressante pour l'étude des quantités relatives en différentes macromolécules telles que les lipides, les protéines et les glucides. L'HRMAS permet quant à elle une analyse plus fine et met en évidence de potentiels chimiomarqueurs intraspécifiques et caractéristiques de certaines zones géographiques.

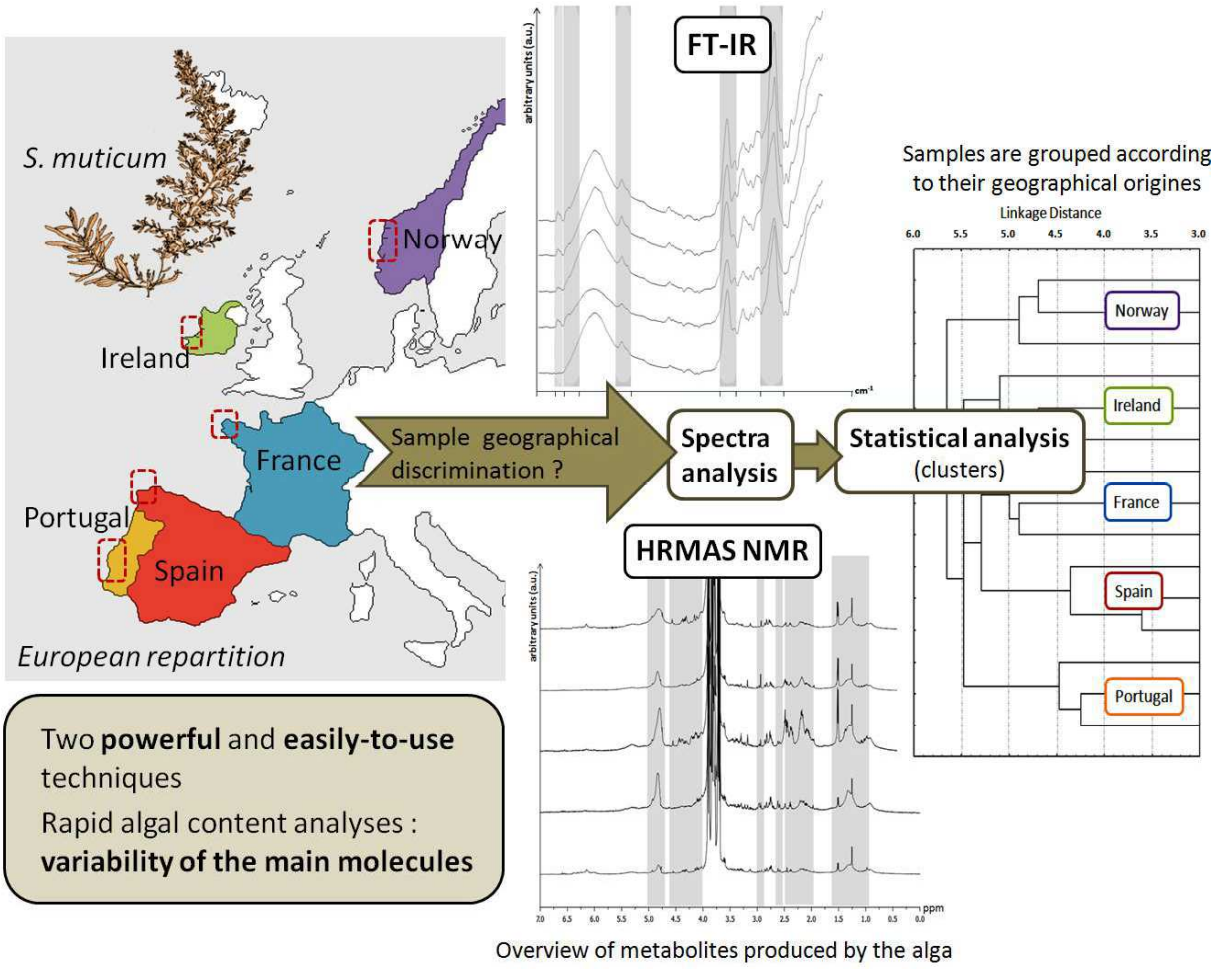


Figure III. 2. "Graphical Abstract" illustrant les objectifs et les résultats de l'étude présentée dans la publication Tanniou *et al.* (2014) **(ci-après).**

ARTICLE IN PRESS

Talanta ∎ (∎∎∎∎) ∎∎∎–∎∎∎

Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Short communication

Rapid geographical differentiation of the European spread brown macroalga *Sargassum muticum* using HRMAS NMR and Fourier-Transform Infrared spectroscopy

Tanniou Anaëlle [a], Vandanjon Laurent [b,d], Gonçalves Olivier [b], Kervarec Nelly [c], Stiger-Pouvreau Valérie [a,*]

[a] LEMAR UMR CNRS UBO IRD IFREMER 6539, Université de Bretagne Occidentale (UBO), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), Technopôle Brest-Iroise, Rue Dumont d'Urville, Plouzané 29280, France
[b] GEPEA UMR CNRS 6144, Université de Nantes, Laboratoire GEPEA, CRTT, 44602 Saint-Nazaire, France
[c] Service RMN-RPE, UFR Sciences et Techniques, Université de Bretagne Occidentale (UBO), Avenue Le Gorgeu, 29200 Brest, France
[d] LBCM EA 3884, Université de Bretagne Sud (UBS), IUEM, Campus de Tohannic, 56000 Vannes, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 October 2013
Received in revised form
21 August 2014
Accepted 2 September 2014

Keywords:
HRMAS NMR
FTIR spectroscopy
Sargassum muticum
Geographical origin discrimination
Latitudinal gradient

ABSTRACT

Two recent techniques based on chemical footprinting analysis, HRMAS NMR and FTIR spectroscopy, were tested on a brown macroalgal model. These powerful and easily-to-use techniques allowed us to discriminate *Sargassum muticum* specimens collected in five different countries along Atlantic coasts, from Portugal to Norway. HRMAS NMR and FT-IR permitted the obtaining of an overview of metabolites produced by the alga. Based on spectra analysis, results allowed us to successfully group the samples according to their geographical origin. HRMAS NMR and FTIR spectroscopy respectively point out the relation between the geographical localization and the chemical composition and demonstrated macromolecules variations regarding to environmental stress. Then, our results are discussed in regard of the powerful of these techniques together with the variability of the main molecules produced by *Sargassum muticum* along the Atlantic coasts.

© 2014 Published by Elsevier B.V.

UNCORRECTED PROOF

1. Introduction

Sargassum muticum is a brown macroalga native from Japan and widely spread along the European Atlantic coasts [1–6]. Distributed from Northward to Southward of Europe, it can be found nowadays from Norway to Portugal, demonstrating its large capability to adapt to different climate conditions (temperature, irradiance, hydrodynamism). This large sustainable biomass could represent a viable biotechnological asset in the European resource development programs. For this reason, *S. muticum* was collected in three sites of five countries (Portugal, Spain, France, Ireland and Norway). The present study is integrated in a global approach to find applications of the huge biomass of *S. muticum* observed along the Atlantic coasts. Previous works carried out on French populations highlighted interesting properties such as anti Reactive Oxygen Species (ROS), i.e. antioxidative [7–11] or antibacterial, antibiotic or antifouling, properties [12–15] of polar and apolar extracts and semi-purified fractions from *S. muticum*. The aim of our present study was then to obtain an overview of the global biochemical composition of specimens from different countries using new techniques for this purpose, and for the end, to know if *S. muticum* populations present or not a chemical adaptation along Atlantic coasts. Results on the lipid, protein or glucid macromolecules quantification are very used as indicators in biotechnology, especially in having information about the physiological state of the studied organism, reflecting for example the metabolic changes in answer to a given environmental stress.

In this context, we were interested in studying the biochemical composition of *S. muticum* populations collected along a latitudinal gradient, by using two non invasive techniques: the *in vivo* ^{1}H HRMAS NMR (High Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance) and the infrared (IR) spectroscopy in order to pointing out or not the sources of chemical profile differences. These two techniques are used for about twenty years in various domains; the HRMAS NMR was already used in chemotaxonomy on various marine models to point out the differences between bacterial strains or algal species for example [16–20]. But this technique had only rarely used to follow physiological processes, in particular on seaweeds. Fourier Transform IR spectroscopy (FTIR) was still never used on macroalgae but was previously used to differentiate species of microorganisms or even strains [21–24]. These two rapid techniques are convenient as they use small

* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 49 88 06; fax: +33 2 98 49 87 72.
E-mail address: valerie.stiger@univ-brest.fr (S.-P. Valérie).

http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.002
0039-9140/© 2014 Published by Elsevier B.V.

Please cite this article as: T. Anaëlle, et al., Talanta (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.002

ARTICLE IN PRESS

amount of sample thus permitting repeated manipulations (allowing a better reproductibility of the results). Finally, these two techniques allowed studying a wide range of molecules, and thus, pointing out very fine differences between samples. We selected then these two interesting techniques as a source of complementary information, FTIR allowing a global chemical variations analysis and the possibility to access to the content in the main macromolecules while HRMAS NMR allows to point out complementary chemical fingerprinting for a species or a given sample [17,19–20].

2. Materials and methods

2.1. Sampling sites and sample preparation

Thalli of *Sargassum muticum* were collected between March and May 2011 in three sites of five countries along a latitudinal gradient in Europe. Samples were collected, from South (March) to North (May), in respectively Portugal, Spain, France, Ireland and finally Norway (Table 1). Sampling period was chosen according to the physiological state of the alga in all the countries. During these periods, *Sargassum muticum* was still immature [1,6]. During collection, only the apical and median parts of the thalli were retained and the holdfast was left in place to allow regrowth and thus minimize collecting impact. Immediately after collection and epiphytes removal, specimens were firstly washed with filtered seawater then with distilled water in order to get rid of residual sediments and salts. The cleaned algal materials were then surface dried with blotting paper towel, chopped into fragments, freeze-dried, powder reduced with a Waring Blender and finally sieved at 250 μm.

2.2. HRMAS-NMR spectroscopy

All HRMAS NMR spectra were obtained using a Bruker DRX 500 spectrometer (Bruker BioSpin, Wissembourg, France) equipped with an indirect HRMAS $^{1}H/^{31}P$ probehead with gradient Z at 25 °C. A typical proton ^{1}H HRMAS spectrum consisted of 64 scans and it was performed with presaturation of the water peak. Each spectrum was phased and baseline-corrected using a polynomial function. Spectra data processing was performed using the software MestReNova 6.0.2 for Windows (Mestrelab Research S.L., Spain). Afterwards the data were subjected to statistical analysis using the Statistica 8 (StatSoft ®) software for PC. For HRMAS NMR, three independent samples per site were analyzed, which represent then a pool of 45 samples analyzed. About 5 mg of each sample were put in a zirconium oxide vial and set into a 4 mm MAS rotor. Around 30 μL of D_2O were added into the rotor with the sample for 2 H field locking (depending on the quantity of the freeze-dried powder). The sample was placed in a rotor spinning around an axis, which is oriented at the so-called magic angle of 54°7 with respect to the magnetic field B_0. Good homogenization and synchronization were obtained at a spinning rate of 5000 Hz. In this study, three HRMAS NMR spectra, corresponding to three independent records for each sample, were obtained by sample.

The statistical procedure used in this study was based on a cluster analysis to illustrate *S. muticum* geographical origin discrimination using HRMAS NMR analysis. Variables used to perform this analysis were the form of the peak (single, double, triple or massive peaks) together with the peak position (δ). These variables were determined for each HRMAS NMR spectrum (three for each site) between 0 and 7 ppm, since some chemical shifts appeared to be different in the samples depending on sites and countries all along this spectral region. We took into account only positive peaks with a noise factor of 4.00. The cluster analysis was then made using a matrix of absence/presence of the observed signals in order to summarize the *in vivo* chemical diversity of the samples.

2.3. FTIR spectroscopy

Infrared spectra were recorded in reflection mode directly on the single reflexion diamond crystal of the ATR (Attenuated Total Reflexion) accessory loaded with few milligrams of freeze-dried algal powder. The Bruker tensor 27 FTIR spectrometer equipped with the ATR platinum module, with a deuterated triglycine sulfate detector RT-DLaTGS and the OPUSv7.0.122 software (Bruker Optics, Germany) was set up with the following parameters. The spectral resolution was fixed to 1 cm^{-1}, the number of scans to 32, the selected spectral range between 4000 and 400 cm^{-1}. Background spectra were collected using the same instrument settings as those employed for the samples and was performed against air. Spectra were recorded for 3 technical replicates,
i.e. 3 biological replicates, per site, representing a total of 45 samples analyzed for all studied countries. The recorded spectra were treated in group to compensate the CO_2/H_2O and the baseline effects and smoothed with the correction tools integrated into the OPUS software. The spectra were then smoothed using the Savitzky–Golay algorithm [25] but for presentation purpose only. For the multivariate analysis, the spectra pre-processing sequence

Table 1
List of sampling data (sites localization) for each country and hydrodynamism conditions.

Country	Region	Sampling date	Locality	Site	Latitude	Longitude	Exposition
Norway	Øygarden	May 17, 2011	Solberg	1	60°35' N	4°47' W	Sheltered
	Øygarden	May 17, 2011	Krækjebærholmen	2	60°35' N	4°50' W	Semi-exposed
	Øygarden	May 17, 2011	Sauøyna	3	60°35' N	4°51' W	Semi-exposed
Ireland	Connaught	April 17, 2011	Clifden	1	53°24' N	10°7' W	Exposed
	Munster	April 18, 2011	Spanish Point	2	52°51' N	9°26' W	Semi-exposed
	Munster	April 18, 2011	Miltown Malbay	3	52°50' N	9°26' W	Semi-exposed
France	Bretagne	April 18, 2011	Fort du Dellec	1	48°21' N	4°34' W	Semi-exposed
	Bretagne	April 18, 2011	Le Minou	2	48°20' N	4°36' W	Semi-exposed
	Bretagne	April 18, 2011	Pointe du Diable	3	48°21' N	4°33' W	Exposed
Spain	Galicia	March 18, 2011	Museo del Mar	1	42°13' N	8°46' W	Semi-exposed
	Galicia	March 18, 2011	Cabo Estay	2	42°11' N	8°48' W	Exposed
	Galicia	March 21, 2011	Cabo Udra	3	42°20' N	8°49' W	Exposed
Portugal	Algarve	April 1, 2011	Queimado	1	37°49' N	8°47' W	Semi-exposed
	Algarve	April 1, 2011	Almograve	2	37°39' N	8°48' W	Semi-exposed
	Algarve	April 1, 2011	Zambujeira	3	37°33' N	8°47' W	Semi-exposed

Please cite this article as: T. Anaëlle, et al., Talanta (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.002

UNCORRECTED PROOF

ARTICLE IN PRESS

was different and excluded the smoothing step, since it could impact the resolution of the data, and therefore decrease the detection of putative important vibrators and their contribution to the FTIR signature. The CO_2/H_2O and base-line effects corrected replicate spectra were averaged to generate a new spectrum from the three original spectra of the same type, i.e. the new spectrum intensities were calculated by averaging original spectra intensities. Then, mean spectra were vector normalized first to account for differences in samples thickness commonly found when working on powders, and second derivative transformed to detect a maximum of vibrators (peak position) and enhance their contribution to the FTIR signature on the whole spectral range [26–29].

Multivariate analysis was performed on the mean, vector normalized, second derived spectra using the Metaboanalyst 2.0 pipeline [30]. Principal component analysis (PCA) and Cluster analysis (Ward algorithm for inter spectral distance calculation) were performed on those pre-processed spectra. Then the replicate spectra were averaged to generate a new spectrum from the three original spectra of the same type, i.e. the new spectrum intensities were calculated by averaging original spectra intensities. Afterwards the data were subjected to cluster analysis employing the Ward's algorithms and using the second derivative and vector normalization preprocessing method to calculate inter-spectral distances.

3. Results and discussion

The ^{1}H HRMAS NMR spectra comparison shown on Fig. 1A (only one spectrum was selected for each country) revealed some differences between the five different sampled countries. As visible on the Fig. 1B, countries presenting the least homogeneous grouping are Spain and Ireland, where the site 1 is different from the two others. This corresponds to the measured geographical distances between the different sites (Table 1). In every case we can notice a clear distinction between the five countries. Some areas present a larger variability, as for example: the aromatic domain towards 5.5 and 6.5 ppm, the edge of peaks between 3.0–5.5 ppm, which corresponded to polyols described as mannitol in *S. muticum* [19], the proportions of the amino acid glutamine/glutamates (carboxylate anions and salts of glutamic acid), against the malic acid/malates (esters and salts of malic acid) (peaks around 2.0–2.5 ppm, Kervarec, pers. comm.) and some unsaturated fatty acids towards 1.0–1.5 ppm (Fig. 1A). Some countries are recognizable rather easily thanks to certain characteristic peaks, as for example the peak towards 2.6 ppm very marked in Spain and the peak at 2.91 ppm very marked in Ireland (Fig. 1A). We can also observe in a general way that sugars (3.0 to 5.5 ppm) are more plentiful and diversified in Norway, France and Portugal while more lipidic compounds (0.8 to 3.0 ppm) are found in Ireland, France and Spain. In view of spectrum it would be rather saturated lipids; even if some unsaturated ones are visible in France and Spain for example towards 4.8 ppm. Differences of composition in fatty acids were already observed in other *Sargassum* species collected from two different geographical zones but never within the same genus [31]. Fig. 1 shows that chemically closed populations resulted from places geographically closed, which is not the case of FTIR dendogram presented on Fig. 3, where the grouping is different. Indeed, populations in Spain and France are the most similar while populations in Norway present the "most original" profile compared with those of the other countries. Samples providing from Norway contained a great amount of malate and sugars (3.5 and 4.5 ppm). The geographical position of populations belonging to the same species has a real effect on chemical composition and this effect is adequately important for allowing their differentiation according to their origin. However, some authors affirm that, in brown algae, geographical variations of marine algae metabolites composition were non-significant [32–33] and could be further due

CORRECTED PROOF

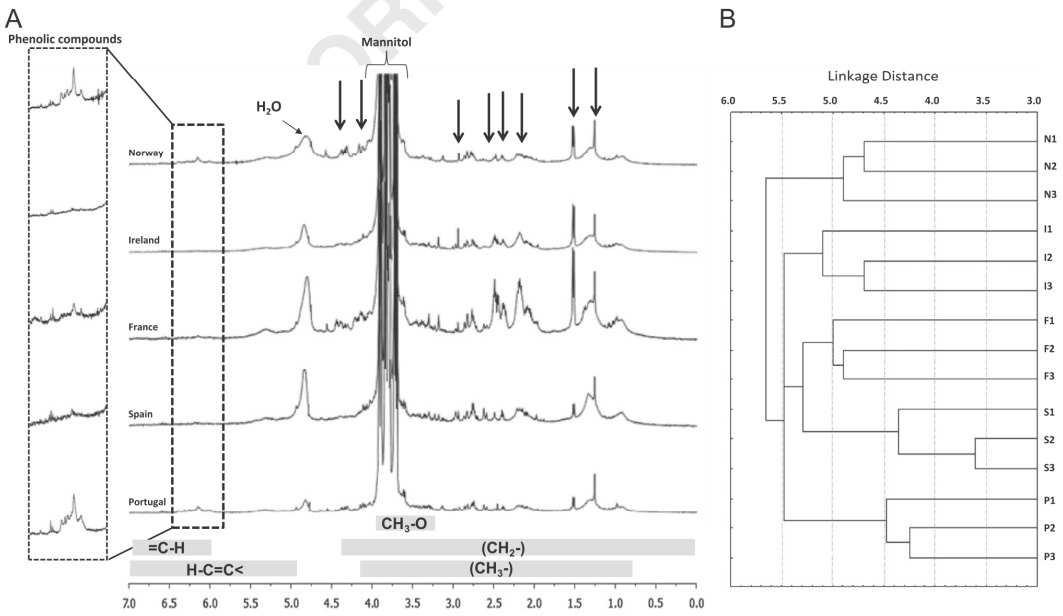


Fig. 1. (A) Typical ^{1}H HRMAS NMR spectra of *Sargassum muticum* sampled in five different countries (only one spectrum is represented by country as the three spectra by site were all identical). Spectral regions are indicated in gray at the bottom and specific differences between countries by arrows at the top. (B) Cluster analysis based on 45 spectral observations issued from Norway (N), Ireland (I), France (F), Spain (S) and Portugal (P) with the numbers 1,2,3 representing the three sites sampled by country, regrouping the triplicate per site.

Please cite this article as: T. Anaëlle, et al., Talanta (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.002

ARTICLE IN PRESS

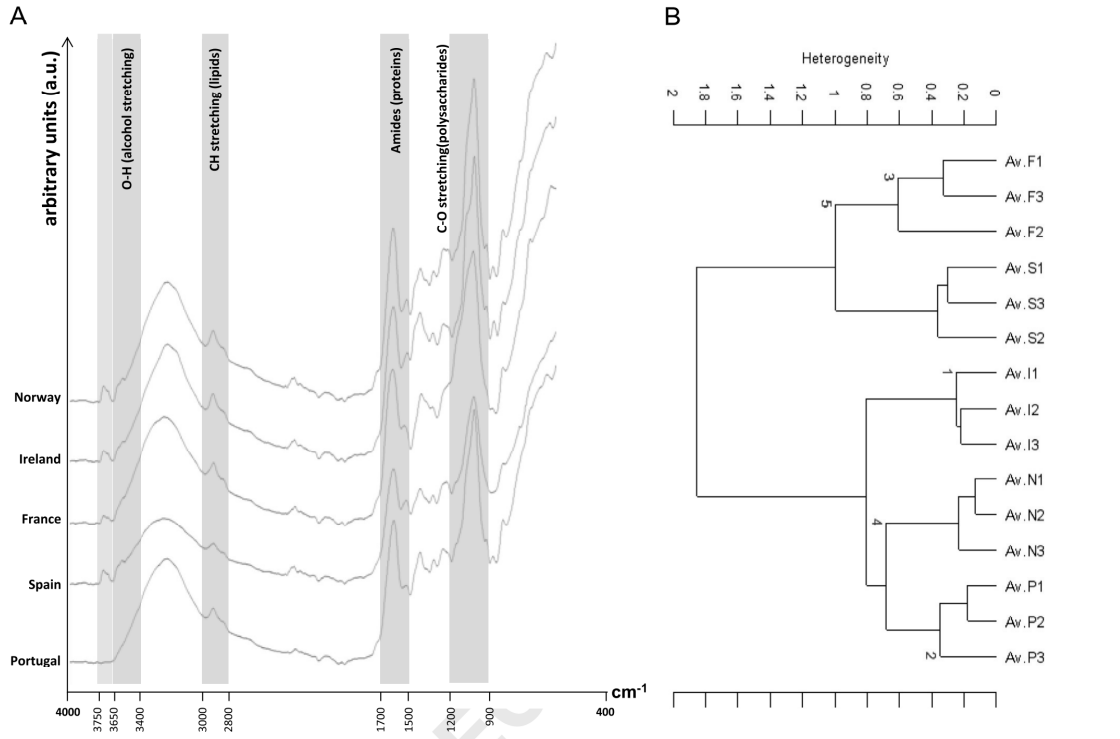


Fig. 2. (A) Spectra from analysis in FTIR of samples of *Sargassum muticum* (averaged spectra calculated by averaging the 3 sites spectra intensities for each country). (B) Cluster analysis performed using the second derivative and vector normalization of the spectra from 400 to 4000 cm^{-1}. The Ward's algorithm was used to make the dendrogam. Letters and numbers as on Fig. 1.

to seasonal variations in *S. muticum* metabolites content [34]. This bias was avoided by harvesting seaweeds in the various countries at the same physiological state during spring 2011 (Table 1). Nevertheless, the same experiment should be carried out during the other seasons to test the seasonality effect on the chemical contents. In addition, it would be also interesting to pursue this experiment on seaweeds collected at the same period the following years to see if the tendencies are confirmed from one year to the next. This technique showed that seaweeds coming from different geographical places could be differentiated by their biochemical profile. Blind assays were realized on spectra of unknown origin allowing to recognize their geographical origin (country and site) with 100% success except for samples resulting from Ireland where sites can be confused; the success rate was then 60% (data not shown). Those scores are upper than those obtained for similar studies [35–36] for food applications on aliment origin.

Fig. 2 permitted to obtain an overview of the intensity of peaks in specific areas of FTIR spectra. The highlighted areas corresponded to the major macromolecules spectral region [37]. Thus, few peaks are characteristic of a single sample. On the other hand, we can quote for example: a peak at 2965 cm^{-1} only visible in France and Spain; at 688 and 3594 cm^{-1} present for samples originated from Norway, Ireland and Spain. A great variability between countries was observed between 800 and 950 cm^{-1} and 1930–2560 cm^{-1}. The intensity of the vibrators bands composing an IR spectrum is proportional to the abundance of the chemical groupings in the analyzed sample (Beer–Lambert law). It is thus possible to obtain, besides the usually exploited qualitative data, quantitative or rather semi-quantitative information. FTIR spectroscopy permitted then to distinguish samples by their geographical origins (Fig. 2). The vector normalized second derivative spectral data were qualitatively analyzed using principal component analysis (PCA) for each algal sample, taking also into account the location of the collection in the considered country. In Fig. 3, results indicated that the five algal samples were clustered into five distinct groups, clearly associated to each geographical origin (axis 2, with a contribution superior to 17% of the total variability). Inside each cluster, it was moreover possible to distinguish subgroups according to the specific location of collection in a considered country (axis 1, with a contribution superior to 36% of the total variability). The clustering results clearly revealed that each algal sample could be distinguished according to its FTIR spectrum, exhibiting moreover differences for the three tested sampling sites for a considered country. Those observations suggested that each algal sample presented its own FTIR signature, depending on its particular chemical composition. Indeed, according to the work of [27–29] this spectral signature could be directly related to the relative amount of the matrix main constitutive molecules (at least lipids, proteins and carbohydrates), which were moreover in our case geographical/climate dependent.

Actually, numerous approaches are developed for the estimation of the relative or absolute intracellular metabolites abundance on the whole cell [38–39]. IR spectroscopy expresses here all its analytical potential compared with classical dosage techniques, because it is not invasive, fast and requires only some milligrams or even micrograms of biomass [40]. The recent works of [41] demonstrated in particular the possibility to estimate the effect of the light intensity variations or the nitrogen and sulfur concentrations on the lipids accumulation for the microalga *Chlamydomonas*

Please cite this article as: T. Anaëlle, et al., Talanta (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.002

ARTICLE IN PRESS

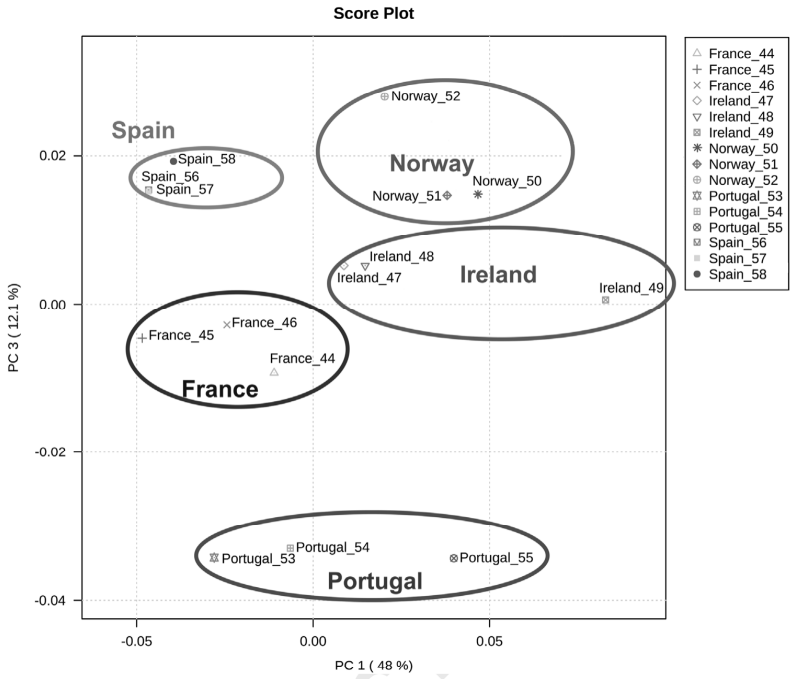


Fig. 3. PCA score plot of the vector normalized second derivative FTIR signatures of the various sample of *Sargassum muticum* collected in Norway, Ireland, France, Spain and Portugal. The legend in the upright corner details the name of the algal samples together with their site of collection and the geographical clusters are highlighted on the score plot.

reinhardtii. These spectral data immediately inform on the presence or the absence (of detection) of a family of macromolecules with regard to another one for a given sample. It is also possible to compare the relative abundances of these molecules (since the concentration of one of them does not vary during the studied process) [38]. On the other hand, the exploitation of the bands intensity in the quantification applications absolved from these macromolecules requires taking precautions because the sources of IR spectra variations are numerous and they may modify the recorded intensities. Here, we can see on Fig. 3 that the proteins compartment (1400–1800 cm^{-1}) did not vary between samples while polysaccharides (1000–1200 cm^{-1}) and lipids (2800–3000 cm^{-1}) area were very variable [37]. Thus, polysaccharides were more present in Norway and France and lipids more present in France, Norway and Portugal. Except for the lipids compartment where the Spanish samples seemed to contain a lot of lipids in HRMAS NMR and not in FT-IR, the results were close between the HRMAS NMR and the FTIR method. The fact is that for present Spanish samples, lipids were saturated for the greater part and thus very visible in HRMAS NMR while the IR gives us an image of total lipids content. But numerous factors influence the appearance of the recorded IR spectra. The relevant works of [42] underlined clearly the importance of these effects, which were widely ignored in numerous studies previous to their investigations. According to these authors, the spectral variations for a succession of samples can be attributed to four different factors: (i) the dispersal effect of a radiation produces wide fluctuations which overlap on the spectra [43] (ii) the presence of a nucleus is also going to modify and to amplify this distortion effect [42] (iii) the variations of intensity observed on the whole IR spectra can be attributed to the heterogeneousness of thickness of the sample and finally, (iv) the significant contribution of the signal of the water on the amide I (primary amide) area (3300–3400 cm^{-1}) [44] which can make difficult the interpretation of the obtained results. To get away from this type of problem it seems thus essential to choose bands with the least possible covering or when it is not possible, because of the complexity of the sample for example, to use more global processing methods which will thus exploit the influence of all the spectral contributions for a given sample. We found recently approaches of relative estimations of macromolecular microalgal contents using IR spectrometry as a routine technique. Stehfest et al. [45] were among the first ones to study the effect of nitrogenous and phosphorous stresses on phytoplanktonic species with IR spectrometry. Recently, Di Giambattista et al. [46] used FTIR as an efficient method to diagnostic the presence of tumor cell death, showing the great potential of this technique also in medical studies.

We can thus admit that whatever the used technique and the observed variations, no specific major molecule seems to be really produced by the seaweeds from the different studied countries, along our chosen latitudinal gradient (Portugal to Norway). Only the relative proportions of each molecule seem to evolve along the latitudinal gradient, as it was already shown in the particular phenolic compounds studied in a previous study [47]. Complementary analyses carried out at the laboratory allowed, thanks to chemical analysis techniques, to validate the variations and the tendencies observed in HRMAS NMR and FTIR. Indeed the colorimetric tests used for the determination of protein and carbohydrates contents for example, show a weak variability of the protein compartment following countries while, on the other hand, lipids and polysaccharides are subjected to big variations in *S. muticum* populations collected along Atlantic coasts [48].

Please cite this article as: T. Anaëlle, et al., Talanta (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.002

ARTICLE IN PRESS

4. Conclusion

In our study both HRMAS NMR and FTIR appeared as two quick and reliable methods for geographical origin discrimination studies together with the obtaining of an overview of biochemical composition of samples. These two relevant techniques provided results analogous to those obtained by standard chemical tests. Their main advantages are that they are quick and easy to use methods, which need low biomass consumption (some milligrams). These techniques are then promising for this type of investigation because they would allow, without preliminary extraction, the simultaneous and fast qualitative overview of macromolecules for a given species with the possibility of connection with the environmental variations. These results are exciting as no DNA polymorphism could be highlighted in populations of *Sargassum muticum* collected in Europe (Viard, pers. comm.). Our chemical procedure could then represent a real tool of traceability for further studies of *S. muticum* in Europe.

Acknowledgments

This study is part of the Ph.D. thesis work carried out by the first author within the Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR UMR 6539) set at the IUEM (UBO-UEB). It was supported by the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (UBO allocation for the first author). This study is part of the BIOTECMAR project contract no. 2008-1/032 for the collection of samples in Europe, and was co-financed with the support of the European Union ERDF – Atlantic Area Program. This study is also related to the research projects INVASIVES (Era-net Seas-era, 2012–2016) and COSELMAR for the analysis of samples.

References

[1] E. Plouguerné, K. Le Lann, S. Connan, G. Jechoux, E. Deslandes, V. Stiger-Pouvreau, Aquat. Bot. 85 (2006) 337–344.
[2] A. Engelen, C. Espirito-Santo, T. Simoes, C. Monteiro, E.A. Serrao, G.A. Pearson, R.O.P. Santos, Eur. J. Phycol. 43 (2008) 275–282.
[3] S. Kraan, J. Appl. Phycol. 20 (2008) 825–832.
[4] M. Incera, C. Olabarria, J.S. Troncoso, J. Lopez, Mar. Ecol. Prog. Ser. 377 (2009) 91–101.
[5] C. Olabarria, I.F. Rodil, M. Incera, J.S. Troncoso, Mar. Env. Res 67 (2009) 153–158.
[6] K. Le Lann, S. Connan, V. Stiger-Pouvreau, Mar. Env. Res 80 (2012) 1–11.
[7] M. Nakai, N. Kagayama, K. Nakahara, W. Miki, Mar. Biotechnol. 8 (2006) 409–414.
[8] T. Kuda, T. Kunii, H. Goto, Jpn. Food Chem. 103 (2007) 900–905.
[9] S. Kumar Chandini, P. Ganesan, N. Bhaskar, Food Chem. 107 (2008) 707–713.
[10] K. Le Lann, C. Jegou, V. Stiger-Pouvreau, Phycol. Res. 56 (2008) 238–245.
[11] A Tanniou, E. Serrano Leon, L. Vandanjon, E. Ibanez, J.A. Mendiola, S. Cerantola, N. Kervarec, S. La Barre, L. Marchal, V. Stiger-Pouvreau, Talanta 104 (2012) 44–52.
[12] C. Hellio, J.P. Marechal, B. Véron, G. Bremer, A. Clare, Y. Le Gal, Mar. Biotechnol. 6 (2004) 67–82.
[13] E. Plouguerné, C. Hellio, E. Deslandes, B. Véron, V. Stiger-Pouvreau, Bot. Mar. 51 (2008) 202–208.
[14] E. Plouguerné, P. Georgantea, E. Ioannou, C. Vagias, V. Roussis, C. Hellio, E. Kraffe, V. Stiger-Pouvreau, Mar. Biotechnol. 12 (2010) 52–61.
[15] A. Bazes, A. Silkina, P. Douzenel, F. Faÿ, N. Kervarec, D. Morin, J.-P. Bergé, N. Bourgougnon, J. Appl. Phycol. 21 (2008) 395–403.
[16] S. Gudlavalleti, C.M. Szymanski, H.C. Jarrell, D.S. Stephens, Carbohydr. Res. 341 (2006) 557–562.
[17] S. Salaün, N. Kervarec, P. Potin, D. Haras, M. Piotto, S. La Barre, Talanta 80 (2010) 1758–1770.
[18] W. Li, Analyst 131 (2006) 777–781.
[19] K. Le Lann, N. Kervarec, C.E. Payri, E. Deslandes, V. Stiger-Pouvreau, Talanta 74 (2008) 1079–1083.
[20] C. Jégou, G. Culioli, N. Kervarec, G. Simon, V. Stiger-Pouvreau, Talanta 83 (2010) 613–622.
[21] D. Helm, H. Labischinski, D. Naumann, J. Microbiol. Methods 14 (1991) 127–142.
[22] D. Naumann, D. Helm, H. Labischinski, Nature 351 (1991) 81–82.
[23] C. Kirschner, K. Maquelin, P. Pina, N.A. Ngo Thi, L.P. Choo-Smith G.D. Sockalingum, C. Sandt, D. Ami, F. Orsini, S.M. Doglia, P. Allouch, M. Mainfait, G.J. Puppels, D. Naumann, J. Clin. Microbiol. 39 (2001) 1763–1770.
[24] C.A. Rebuffo, J. Schmitt, M. Wenning, F. von Stetten, S. Scherer, Appl. Environ. Microbiol. 72 (2006) 994–1000.
[25] A. Savitzky, M.J. E. Golay, Anal. Chem. 36 (1964) 1627–1639.
[26] A. Domenighini, M. Giordano, J. Phycol. 45 (2009) 522–531.
[27] M.K. Kim, K.H. Jeune, J. Microbiol. Biotechnol. 19 (2009) 1206–1212.
[28] M. Mecozzi, M. Pietroletti, A. Tornambe, Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 78 (2011) 1572–1580.
[29] M. Pietroletti, A. Capobianchi, E. Ragosta, M. Mecozzi, Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 77 (2010) 673–679.
[30] J. Xia, R. Mandal, I.V. Sinelnikov, D. Broadhurst, D.S. Wishart, Nucleic Acids Res. 40 (2012) W127–W133.
[31] V.E. Vaskovsky, S.V. Khotimchenko, B. Xia, L. Hefang, Phytochemistry 42 (1996) 1347–1356.
[32] A. Praud, R. Valls, L. Piovetti, B. Banaigs, J.-Y. Benaïm, Phytochemistry 40 (1995) 495–500.
[33] R. Valls, L. Piovetti, Biochem. Syst. Ecol. 23 (1995) 723–745.
[34] G.V. Joshi, C.A. Gowda, Ind. J. Mar. Sci. 4 (1975) 165–168.
[35] L. Shintu, S. Caldarelli, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 4148–4202.
[36] L. Shintu, S. Caldarelli, B.M. Franke, Meat Sci. 76 (2007) 700–707.
[37] J. Coates, A practical Approach Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester (2006) 10815–10837.
[38] A.P. Dean, D.C. Sigee, B. Estrada, J.K. Pittman, Bioresour. Technol. 101 (2010) 4499–4507.
[39] H. Wagner, Z. Liu, U. Langner, K. Stehfest, C. Wilhelm, J. Biophoton. 3 (2010) 557–566.
[40] R. Davis, L.J. Mauer, in: A. Mendez-Vilà (Ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2, Formatex Research Center, 2010, pp. 1582–1594.
[41] T. Cakmak, P. Angun, Y.E. Demiray, A.D. Ozkan, Z. Elibol, T. Tekinay, Biotechnol. Bioeng. 109 (2012) 1947–1957.
[42] M. Romeo, B. Mohlenhoff, M. Diem, Vib. Spectrosc. 42 (2006) 9–14.
[43] G. Mie, Ann. Phys. (Leipzig) 25 (1908) 377–445.
[44] C. Berthomieu, R. Hienerwadel, Photosynth. Res. 101 (2009) 157–170.
[45] K. Stehfest, J. Toepel, C. Wilhelm, Plant Physiol. Biochem. 43 (2005) 717–726.
[46] L. Di Giambattista, D. Pozzi, P. Grimaldi, S. Gaudenzi, S. Morrone A.C. Castellano, Anal. Bioanal. Chem. 399 (2011) 2771.
[47] A. Tanniou, L. Vandanjon, M. Incera, E. Serrano Leon, V. Husa, J. Le Grand J.L. Nicolas, N. Poupart, N. Kervarec, A. Engelen, R. Walsh, F. Guérard, N. Bourgougnon, V. Stiger-Pouvreau, J. Appl. Phycol. 26 (2014) 1215.
[48] A. Tanniou, Océanologie Biologique, Université de Bretagne Occidentale (2014) 217–237 (PH.D. Thesis).

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article as: T. Anaëlle, et al., Talanta (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.002

III.2.4. Conclusion

Nous présentons ici deux méthodes analytiques qui permettent d'obtenir une empreinte chimique rapide, en quelques minutes, du contenu chimique de *Sargassum muticum* et ce, en utilisant quelques milligrammes de poudre d'algues. Ces deux techniques analytiques apparaissent comme réellement pertinentes dans une optique de discrimination des algues en fonction de leur provenance géographique, pour une même espèce. Elles ont l'avantage de ne pas nécessiter d'étape préalable d'extraction de biomolécules, et donc de ne pas se restreindre à l'étude d'une portion du métabolome. En effet, les analyses en RMN classique sur des échantillons liquides nécessitent une extraction sélective de biomolécules puisque le choix du solvant conditionne le type de molécules extraites. La RMN *in vivo* permet de visualiser une plus grande part des composés présents dans un échantillon. De la même manière, l'IR permet un gain de temps pour la qualification et la semi-quantification des macromolécules d'un échantillon, s'affranchissant des méthodes de dosages classiques pas toujours sélectives.

En biologie marine ou en microbiologie, l'IR est d'avantage utilisé pour l'observation de catégories de molécules plutôt que de composés précis. Elle est également utilisée afin d'étudier, de manière systématique et rapide, l'influence de paramètres de culture sur la production d'un certain type de macromolécules chez les microalgues. Les travaux récents de Cakmak *et al*. (2012) ont par exemple démontré qu'il était possible d'estimer, par spectroscopie IR, l'effet des variations de l'intensité lumineuse ou de la concentration en azote et en soufre sur l'accumulation des lipides chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*. Dans ce domaine, Stehfest *et al.* (2005) ont été les premiers à étudier l'effet de stress azoté ou d'excès de phosphore sur le phytoplancton par spectroscopie IR. Dans notre étude, l'IR a également montré ici sa capacité à discerner différentes provenances d'échantillons d'après leur composition en macromolécules telles que les carbohydrates, les protéines et les lipides. Cette démarche nous a permis également de donner de premières informations sur les variations chimiques liées à la provenance des algues et donc potentiellement liés aux paramètres environnementaux. En ce qui nous concerne, il est intéressant de commencer par ce type d'analyse, ne sachant pas quels sont les compartiments susceptibles de subir des variations chez l'algue brune *Sargassum muticum*.

NB : Dans notre étude, l'appareillage utilisé est spécifique aux échantillons de taille moyenne. Il existe par ailleurs des techniques spécifiques aux petits échantillons (solutions peu concentrées par exemple). On parlera alors de microspectroscopie : couplage entre un spectromètre IR et un microscope. Cette technique permet l'étude de micro-échantillons (taille ≈10 μm). En micro-spectroscopie FT-IR, seule la transmission est utilisée pour l'enregistrement. Le mode de réflexion étant réservé à des échantillons plus épais lorsque l'épaisseur de l'échantillon est incompatible avec une absorbance raisonnable. Actuellement, la micro-spectroscopie FT-IR est largement utilisée en microbiologie ou dans le domaine médical et ce, à différentes échelles : moléculaire (lipides, protéines, polysaccharides et ADN...), cellulaire (sur des bactéries, levures et cellules...) ou tissulaire (sur des échantillons de peau ou d'organes...).

La Résonance Magnétique Nucléaire ^{1}H HR-MAS est une des premières méthodes employées dans le but de distinguer des espèces par leur profil chimique. Elle permet de visualiser le contenu d'échantillons directement à partir de tissus biologiques (Desmoulins *et al.*, 2007). Contrairement aux autres études utilisant cette technique pour la discrimination chimique d'échantillons algaux entre eux (Le Lann *et al*., 2008; Jegou *et al*., 2010). Il n'existe, à notre connaissance, aucune étude portant sur la différenciation géographique d'échantillons d'une même espèce. En effet, on aurait pu s'attendre à observer peu de variations entre les différents profils chimiques obtenus. Or notre étude démontre bien la puissance de cette technique, permettant de discerner des profils chimiques relativement proches. Dans le cadre de nos travaux, l'analyse RMN HR-MAS des échantillons de *Sargassum muticum* a mis en évidence des différences qualitatives dans les spectres, qui témoignent de profils chimiques caractéristiques pour chaque pays et même pour chacun des sites étudiés. Dans notre analyse, deux zones dont celle des composés aromatiques (entre 5.5 et 6.5 ppm) et celle situées entre 4.0 et 4.6 ppm apparaissent comme étant les plus discriminantes.

L'inconvénient de la RMN HR-MAS par rapport à la spectroscopie IR, est qu'elle nécessite l'étude de signaux fins et bien résolus. Il est donc plus difficile de distinguer et d'attribuer chacun des nombreux signaux observables. De plus, dans les spectres provenant des cinq pays étudiés, la zone de déplacements chimiques comprise entre 2 et 5 ppm (et particulièrement entre 3 et 4.5 ppm) renfermait de très nombreux signaux relativement superposés (certains dédoublés), rendant difficiles les comparaisons entre spectres. C'est la raison pour laquelle la discrimination résultant de notre analyse statistique (ACP) est en grande partie due à l'étude des déplacements chimiques situés avant 2 ppm et au-delà de 5 ppm, où les signaux sont moins nombreux et plus simples à discerner. Un autre inconvénient de cette technique par rapport à l'IR est que seules les molécules possédant une dynamique moléculaire suffisamment rapide donneront des signaux RMN HR-MAS, comme les petites molécules intracellulaires par exemple. En effet, la rotation à haute fréquence n'a d'effet que sur les métabolites dissous ; les composants des parois par exemple ne seront pas visibles.

Comme la RMN HR-MAS, la spectroscopie IR a, elle aussi, quelques limites, dues en particulier à la nature de l'échantillon surtout lorsqu'on cherche à doser quantitativement les macromolécules observées. En effet, l'exploitation de l'intensité de ces bandes nécessite de prendre des précautions car les sources de variation des allures des spectres IR et donc des intensités enregistrées sont nombreuses. On en distinguera deux principales :

- L'influence de la nature de l'échantillon est très importante. En effet, lorsqu'on enregistre un spectre IR sur un échantillon biologique, d'importantes variations spectrales sont observées (variations d'intensité, effet d'ondulation, d'activité cellulaire,..) (Romeo *et al*., 2006). Les travaux effectués sur des organismes unicellulaires, soulignent clairement l'importance de ces effets. Selon les auteurs, les variations spectrales pour une série d'échantillons cellulaires peuvent être attribuées à trois facteurs distincts :

(1)L'effet de dispersion d'un rayonnement produit de larges fluctuations qui se superposent sur le spectre (Mie, 1908). En effet, les sphères diélectriques sont connues

pour disperser un rayonnement électromagnétique si la longueur d'onde de la lumière considérée est comparable à la taille de la sphère diélectrique. Cela provoque une distorsion de forme sinusoïdale impactant la forme globale de la ligne de base du spectre IR. Ainsi suivant la taille des particules algales des effets plus ou moins marqués seront enregistrés.

(2) La présence d'un noyau va également modifier et amplifier cet effet de distorsion. Les simulations de Romeo *et al.* (2006) effectuées pour une particule de taille proche de celle d'un noyau de cellule eucaryote (4,2 μm) montrent que cet effet vient modifier drastiquement la forme de la ligne de base du spectre FT-IR et donc impacter les intensités des bandes des vibrateurs C-H (autour de 3000 cm^{-1}).

(3) Les variations d'intensité observées sur l'ensemble du spectre IR d'une cellule peuvent être attribuées à l'hétérogénéité d'épaisseur d'une cellule et au ratio noyau/cytoplasme. Pour une cellule entière l'intensité du signal de la bande amide I des protéines sera donc principalement gouvernée par la contribution du noyau qui, s'il décroit en épaisseur durant la phase de séchage (préparation de l'échantillon), passant par exemple de 10 à 7 μm provoquera un changement global du signal des protéines d'une dizaine de % environ (Loi de Beer-Lambert) (Romeo *et al.*, 2006). On peut imaginer que l'effet est d'autant plus important sur des tissus entiers comme c'est le cas dans notre étude.

- Il faut également tenir compte de l'effet de recouvrement des signaux. Berthomieu et Hienerwadel (2009) ont souligné la contribution non négligeable du signal de l'eau sur la bande amide I. Pour s'affranchir de ce type de problème il paraît donc indispensable de choisir les bandes avec le moins de recouvrement possible ou lorsque cela n'est pas possible, du fait de la complexité de l'échantillon par exemple, de recourir à des méthodes de traitement plus globales qui exploiteront donc l'influence de toutes les contributions spectrales pour un échantillon donné. Enfin, pour éviter les contaminants extérieurs : le microscope IR peut être placé dans une enceinte de purge (azote gazeux ou air sec) pour assurer une protection efficace contre les influences atmosphériques (vapeur d'eau et gaz carbonique).

Les pistes étant ouvertes quant aux macromolécules susceptibles de varier suivant la provenance géographique de nos échantillons, et donc *a fortiori* des paramètres environnementaux, il s'agit maintenant de doser par des méthodes chimiques ces différentes molécules afin de valider ces observations et d'analyser plus en détail les différents compartiments du métabolome de *Sargassum muticum*.

III.3. Suivi de populations naturelles de Sargassum muticum le long d'un gradient latitudinal Portugal-Norvège

III.3.1.Introduction

Les profils chimiques obtenus en RMN HR-MAS et en IR varient énormément suivant les pays échantillonnés (Paragraphe III.2), nous avons donc entrepris d'examiner ces variations par une approche plus « biochimique » en nous intéressant à chacun des compartiments biochimiques ayant montré quelques variations. Ainsi dans un premier temps, des dosages chimiques des glucides et des protéines ont été effectués, respectivement, grâce aux méthodes de Dubois *et al.* (1956) et de Bradford (1976).

Certains compartiments ont été étudiés de manière plus approfondie. Ainsi une analyse en chromatographie liquide haute pression (HPLC) du contenu pigmentaire a été effectuée : nous nous intéresserons aux caroténoïdes et chlorophylles présents chez *Sargassum muticum*. Les caroténoïdes, avec les phlorotannins, sont impliqués dans la photoprotection des algues brunes (*cf.* Chapitre I). Dans le Chapitre IV, nous présenterons des résultats concernant les phlorotannins qui complèteront cette étude. Une analyse plus détaillée du contenu en différents acides gras a également été réalisée en chromatographie en phase gazeuse (GC) afin d'apprécier les variations de teneurs en acides gras suivant leur degré de saturation (*cf.* chapitre I).

D'autre part, les thalles ont été mesurés afin de comprendre l'influence des paramètres environnementaux sur leur croissance. En effet la température ou la salinité de l'eau ont un réel impact sur la longueur des thalles (Hwang *et al.,* 2004 ; Plouguerné *et al.*, 2006).

Enfin, la composition chimique des algues (pigments, lipides, protéines et polysaccharides) le long du gradient latitudinal est discutée en relation avec les dates de colonisation de l'espèce ainsi que les paramètres environnementaux.

Le travail mené permettra de répondre à la question suivante :

Comment *Sargassum muticum* a-t-elle répondu en termes de composition chimique (macromolécules principales : protéines, glucides, lipides et pigments) aux nouvelles conditions environnementales présentes dans les milieux colonisés ?

III.3.2. Matériels et méthodes

III.3.2.1. Echantillonnage et mesure des thalles

Après récolte (*cf.* Chapitre I), les thalles ont ensuite été mesurés au moyen d'un double décimètre avant leur congélation (moyenne faite sur vingt individus). La taille d'un individu correspond à la longueur de la base de l'axe principal jusqu'à l'extrémité de la plus grande latérale (Stiger *et al.*, 1999a,b).

III.3.2.2. Concentration en glucides totaux

Le dosage des glucides totaux est effectué selon la méthode colorimétrique au phénol de Dubois *et al.* (1956), miniaturisée en fin de protocole, afin de pouvoir être utilisée sur microplaques. L'hydrolyse des glucides est réalisée en présence d'acide sulfurique à chaud. Les monosaccharides obtenus sont déshydratés et réarrangés pour former du furfural (à partir des pentoses) ou de l'hydroxy-méthyl furfural (à partir des hexoses). Ces composés conduisent à une coloration jaune caractéristique, par condensation avec le phénol. Les réactifs utilisés sont une solution aqueuse de phénol 50 $g.L^{-1}$ et d'acide sulfurique concentré à 98%.

Les échantillons sont centrifugés (10 min à 13000 rpm), le culot obtenu est ensuite lavé avec de l'eau déminéralisée. Après une deuxième centrifugation (10 min à 13000 rpm), le culot obtenu est remis en suspension dans un volume d'eau déminéralisée donné, afin que la concentration en biomasse soit inférieure à 1 $mg.mL^{-1}$. Une gamme étalon est préparée avec des solutions de glucose entre 0 et 0.4 $mg.mL^{-1}$. Le dosage consiste à mélanger 500 µL d'échantillon dilué avec 500 µL de solution de phénol et 2.5 mL d'acide sulfurique (ajouté rapidement en surface du mélange) dans des tubes en verre. Les solutions non mélangées sont incubées pendant 10 min à température ambiante avant d'être agitées au vortex (3000 rpm, 10 s) puis incubées 30 minutes au bain-marie à 35°C. Pour finir, 200 µL de chaque mélange est ajouté très rapidement sur une microplaque. La densité optique est mesurée **immédiatement** à 492 nm. Les teneurs totales en polysaccharides (en équivalent glucose) sont exprimées en % du poids sec de l'algue.

III.3.2.3. Concentration en protéines totales

Les méthodes de Lowry et Bradford ont été testées pour le dosage des protéines. Seule la méthode de Bradford, permettant le moins d'interférences avec d'autres composés, a été utilisée dans la restitution finale des résultats.

a) Dosage par la méthode de Bradford

La méthode de Bradford (1976) est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance, se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines. La forme anionique (liée) du colorant est bleue, et possède un spectre d'absorption maximal estimé à 595 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon. Contrairement aux autres méthodes de mesure des protéines, la méthode de Bradford est moins sensible aux interférences par divers agents présents dans les échantillons de protéines. Elle est toutefois affectée par les détergents, modifiée par le pH, et donne un résultat positif également aux polyphénols hydrosolubles de haut poids moléculaires, comme les tanins par exemple. De même, les acides aminés, les peptides et les protéines de bas poids moléculaire (<3000 Da) ne sont pas détectés par cette méthode. Dans notre étude, pour plus de rapidité, ce test a été miniaturisé pour l'utilisation de microplaques lors de l'étape de lecture de Densité Optique (DO).

Une gamme étalon est préparée à partir de différentes concentrations de BSA (Albumine de Sérum Bovin) allant de 0 à 1 mg. mL^{-1}. Après addition de 1 mL de NaOH 2N sur 200 mg de poudre d'algue lyophilisée, l'hydrolyse alcaline de la biomasse s'effectue au bain-marie à 95°C pendant 6 min (la concentration de l'échantillon à tester, à cette étape, ne doit pas dépasser 1 $g.L^{-1}$ sans quoi la méthode ne serait plus linéaire). Après refroidissement sous l'eau, l'hydrolysat obtenu est neutralisé par l'ajout de 1 mL de HCl 1.6 N. Les fragments cellulaires sont éliminés par centrifugation (10 min, 6000g). Afin d'éliminer les traces de composés phénoliques, 50 mg de PVPP sont ajoutés aux échantillons. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et dilué à la concentration désirée. Le dosage des protéines consiste alors à mélanger, dans la microplaque 10 µL d'échantillon dilué ou de standard (BSA) avec 200 µL de réactif de Bradford. Après 15 min d'incubation, la densité optique est mesurée à 590 nm (la coloration reste stable pendant environ 30 min). La concentration en protéines (en équivalent BSA) est exprimée en % du poids sec de l'algue.

b) Dosage par la méthode de Lowry

Le dosage des protéines selon la méthode de Lowry *et al*. (1951) a été également utilisé sur nos échantillons. Le principe est le suivant : après formation d'une liaison cuivrique entre les protéines et l'ion Cu^{2+} en milieu basique, un composé phosphomolybdique-phosphotungstique du réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté. Celui-ci est réduit par fixation sur le complexe protéine-cuivre et prend alors une coloration bleu-vert. Cette technique permet de réaliser des mesures dans des mélanges pauvres en protéines ou dans des solutions relativement diluées. Cependant, la méthode de Lowry n'est pas totalement fiable à cause des interférences dues au réactif. Comme pour le dosage de Bradford elle réagit positivement aux composés phénoliques en solution.

Les échantillons et la gamme étalon sont préparés de la même manière que pour le dosage de Bradford ; seule l'étape de mélange sur microplaque est différente, ne faisant pas appel au même réactif. Comme pour Bradford, le protocole initial a été adapté pour l'utilisation sur microplaques. Le dosage sur microplaque consiste donc à mélanger 167 µL d'une solution préparée extemporanément (mélange d'une solution de Na_2CO_3 20 $g.L^{-1}$ dans du NaOH 0.1 N avec une solution de $CuSO_4.5H_2O$ 5 $g.L^{-1}$ dans de l'eau déminéralisée dans les proportions 50:1) et 33 µL d'échantillon ou de standard. Après 10 min d'incubation, 17 µL de réactif de Folin dilué au ½ sont ajoutés. Les microplaques sont ensuite incubées pendant 30 min à l'obscurité. Enfin, la densité optique est rapidement mesurée à 620 nm (coloration stable pendant environ 30 min). La quantité de protéine (en équivalent BSA) est exprimée en % du poids sec de l'algue.

NB : Le PVPP a été utilisé suite à un test comparatif des valeurs obtenue avec et sans ce traitement. Plouguerné *et al.* (2012) avaient déjà utilisés cette molécule à des fins différentes, à savoir pour récupérer les phlorotannins d'un échantillon avant dosage. Il s'agissait de mesurer la part des phlorotannins dans les interférences possibles lors de ces tests. Le réactif de Folin-Ciocalteu étant utilisé tout au long de notre étude pour le dosage des composés phénoliques, il semblait indispensable de les éliminer des échantillons avant de doser les protéines par la technique de Lowry en particulier.

III.3.2.4. Composition en pigments

a) Extraction et préparation des échantillons

La poudre de *Sargassum muticum* lyophilisée, provenant des différents pays a été soumise à deux extractions successives sous agitation, à 4°C et à l'obscurité. Pour la première extraction, 50 mg de poudre ont été extraits dans un tube Eppendorf avec 1 mL de solvant (Acétone à 90 % en solution aqueuse) durant 30 minutes. Le mélange extrait/poudre a ensuite été centrifugé à 15 000 tours/minute, pendant 5 minutes. Le surnageant (extrait) ainsi récupéré est conservé à 4°C. Afin d'épuiser la poudre, une deuxième extraction est effectuée sur la poudre résiduelle: 1 mL d'acétone 90 % a été rajouté, et l'extraction a duré 12 heures. Après centrifugation et récupération du deuxième surnageant, les deux extraits sont finalement rassemblés pour former l'extrait brut. Avant injection sur système de Chromatographie Liquide Haute Pression (HPLC), l'extrait brut est nettoyé par filtration (filtre nylon, Ø = 0.45 µm). Ensuite, 50 µL de tampon acétate d'ammonium (0.5 mol/L, pH 7.2 ajusté avec une solution d'hydroxyde de sodium) sont mélangés à 150 µL d'extrait brut filtré. Les 200 µL résultants sont ensuite déposés dans un vial, lui-même placé dans le carrousel de l'injecteur automatique du système de HPLC.

NB : L'utilisation d'un mélange aqueux (acétone:Eau 90:10) lors de l'extraction permet de limiter le phénomène de dégradation de pigments pendant l'extraction (Latasa *et al.*, 2001).

b) Séparation et dosage par chromatographie liquide haute performance

La méthode de séparation des pigments et de dosage par HPLC utilisée est une adaptation de Bidigare *et al*. (2005) de la méthode initialement mise au point par Wright *et al*. (1991). Nous avons cherché à doser les pigments suivants :

-Chlorophylles : Chl a et Chl c2

-Caroténoïdes : fucoxanthine, violaxanthine, zéaxanthine et β-carotène

La méthode de séparation sélectionnée s'appuie sur les différences de polarité de ces molécules. Chaque analyse consiste en l'injection de 10 µL d'échantillons. Les molécules sont séparées par chromatographie en phase inverse; les pigments seront plus ou moins retenus dans le système du fait des interactions entre la colonne de chromatographie et le solvant d'élution. Classiquement, la détection est réalisée grâce à l'absorption de ces pigments dans le domaine de la lumière visible.

L'attribution des signaux est réalisée grâce à l'injection de standards de pigments chlorophylliens et caroténoïdes (DHI, Danemark). Nous avons comparé les temps de rétention et les spectres d'absorption et vérifié la cohérence de nos résultats par rapport aux données issues de la littérature. La quantification a été réalisée par injection d'une gamme de différentes concentrations de standards afin d'établir la correspondance entre l'aire des pics et la quantité de produit. Le matériel utilisé est un système de chromatographie Waters, équipé d'un injecteur automatique (Waters 717 plus Autosampler), d'une pompe (Waters 600 Controller), d'un détecteur à barrette de diodes (PhotoDiode Array detector, Waters). La

colonne chromatographique utilisée est en phase inverse : Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6×150 mm; 5 µm (Agilent Technologies) surmontée d'une pré-colonne C18 (SecurityGuard, Phenomenex) (Pôle biochimie du LEMAR, équipement amicalement prêté par Pr. Fabienne Guerard). Nous avons utilisé un mélange de trois solvants (qualité HPLC) pour la séparation :

- **Solvant A :** 800 mL de méthanol, 200 mL de tampon acétate d'ammonium

(0.5 mol/L, pH 7.2) et 0.1 g d'hydroxytoluène butylé (BHT)

- **Solvant B :** 875 mL d'acétonitrile, 125 mL d'eau ultrapure et 0.1 g de BHT

- **Solvant C :** Acétate d'éthyle.

Les conditions d'injection des solvants sont présentées dans le tableau III.1

Tableau III. 1. Gradient de solvants A, B et C, utilisé au cours des analyses HPLC.

Temps (min)	Débit	%A	%B	%C	Etape
0	90	10	0	1	Injection
1	0	100	0	1	Gradient linéaire
11	0	78	22	1	Gradient linéaire
27,5	0	10	90	1	Gradient linéaire
29	0	100	0	1	Gradient linéaire
36	90	10	0	1	Equilibration

Sur les chromatogrammes obtenus, on peut ainsi observer plusieurs « pics » correspondant aux différents pigments extraits. La Figure III.2 présente un chromatogramme typique montrant la séparation des pigments pour un extrait de S*argassum muticum*.

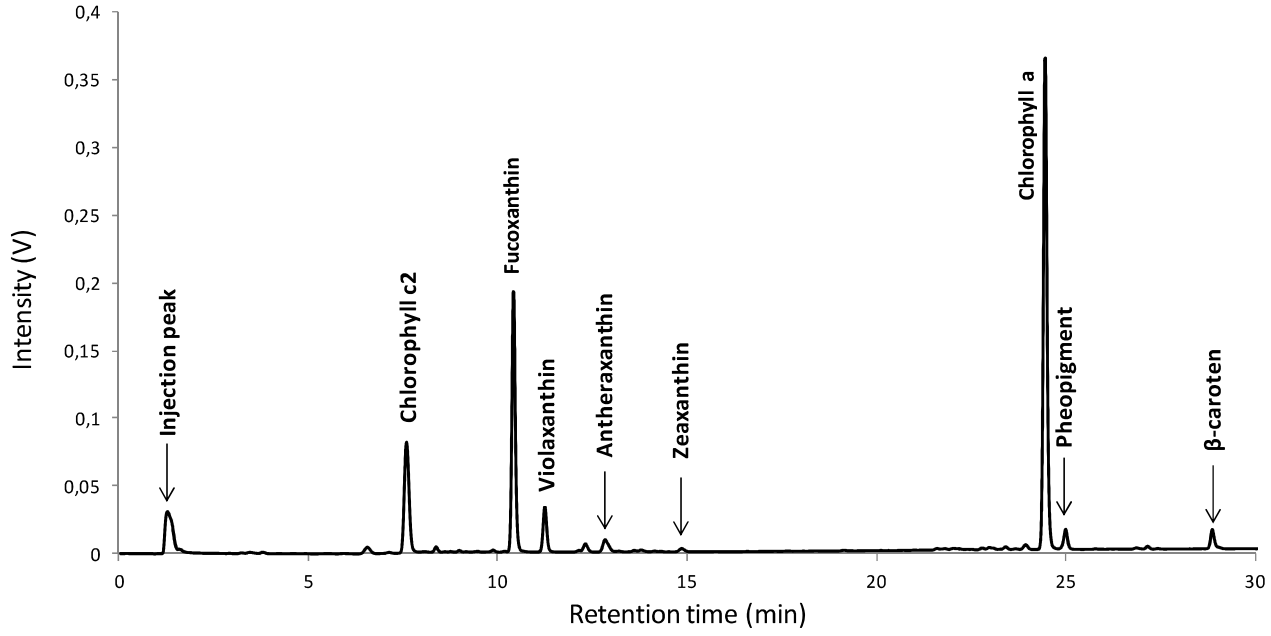


Figure III. 3. Chromatogramme d'un échantillon de *Sargassum muticum* révélant la présence de neuf pigments (détection à λ=435nm)

Pour un même échantillon, les résultats obtenus sont des concentrations en pigments exprimés en % du poids sec de l'algue.

III.3.2.5. Composition en acides gras

a) Extraction des lipides totaux

Afin d'augmenter l'efficacité de l'extraction, la poudre d'algues lyophilisée a été réhydratée avec de l'eau distillée : 10 mg pour 40 µL. L'extraction des lipides est ensuite effectuée à l'aide d'un mélange apolaire chloroforme/méthanol (2:1, v/v). Afin de s'assurer de l'extraction complète des lipides, les échantillons sont passés aux ultrasons puis maintenus 2 h sous agitation à l'obscurité. Le BHT (Butylhydroxytoluène) à 0.01% (w/w) est ajouté au mélange afin de protéger les échantillons de l'oxydation avant de les conserver à -20°C sous azote avant analyse.

b) Dosage des acides gras par chromatographie en phase gazeuse

Les aliquots obtenus après extraction des lipides (1/10) sont évaporés à sec sous azote. Après l'addition de 800µL de BF_3 (trifluorure de bore) et d'acide tricosanoïque comme étalon interne, les aliquots sont transestérifiés pendant 10 min à 100°C. Après refroidissement et addition de 800 µL d'hexane, la phase organique contenant des esters méthyliques d'acides gras est ensuite rincée 3 fois avec 1.5 mL d'hexane saturé en eau. Les esters méthyliques d'acides gras sont récupérés et analysés grâce à un système de Chromatographie en phase gazeuse munie d'un détecteur FID (détecteur à ionisation de flamme) et équipé d'un système d'injection dans la colonne sans étape préalable de vaporisation (GC-FID 6890, Agilent) (**Pôle lipides marins du LEMAR, analyses GC effectuées par Dr. Fabienne Le Grand**). Les esters méthyliques d'acides gras sont identifiés au moyen d'un mélange de 37 standards d'esters méthyliques d'acides gras (FAME pour Fatty Acid Methyl Ester) et d'un mélange connu de standard provenant d'algues marines. Les concentrations en acides gras sont exprimées en pourcentage molaire du contenu total en acide gras.

III.3.2.6. Analyse statistiques des données

Toutes les analyses sont effectuées en triplicat, et les résultats sont présentés sous la forme de moyenne ± écart type. Le logiciel Statistica 8 (StatSoft ®) a été utilisé pour toutes les analyses. L'homogénéité des variances a été testée grâce au test de Brown- Forsythe avec un risque 5%. Les données qui ne satisfont pas aux critères de normalité et d'homoscédasticité sont transformées par la fonction racine carrée. Ensuite, des analyses de variance (ANOVA), ont été menées, par degré, avec le facteur 'site' imbriqué dans le facteur 'pays', suivies du test *a posteriori* de Tukey. Une analyse en composante principale (ACP) a été utilisée sur les données concernant la composition pigmentaire des algues afin d'illustrer les différences de composition suivant l'origine géographique des échantillons. Cette analyse a été conduite sur 45 échantillons (correspondant aux triplicat des trois sites pour chacun des cinq pays). Les variables utilisée pour effectuer cette ACP étaient les concentrations en pigments dosés c'est-à-dire en : Chl a et c2, B-carotène, violaxanthine, zeaxanthine et fucoxanthine. Enfin, dans un second temps afin de comprendre comment variait la composition des algues en différentes molécules dosée (c. à d. lipides, glucides, protéines..) des analyses de la covariance

(ANCOVA) ont été effectuées sur les différents compartiments avec les facteurs 'pays' et 'site' comme facteurs fixes et les paramètres environnementaux comme co-variables. Finalement, les ANCOVA ne permettant pas l'observation de variations étant donné la grande différence d'échelle entre la variabilité des concentrations en molécules et celle des paramètres environnementaux (ne variant pas ou très peu d'un site à l'autre - d'après les mesures effectuées par satellite) ; des analyses de corrélations entre la composition biochimique des algues et les paramètres environnementaux ont été conduites. Le test choisi utilisait le coefficient de corrélation de Pearson (*r*).

III.3.3.Résultats

III.3.3.1. Taille des individus échantillonnés

La figure III.3 présente la taille moyenne des individus (n=20) pour chaque site et pays échantillonnés le long du gradient latitudinal Portugal-Norvège au printemps 2011.

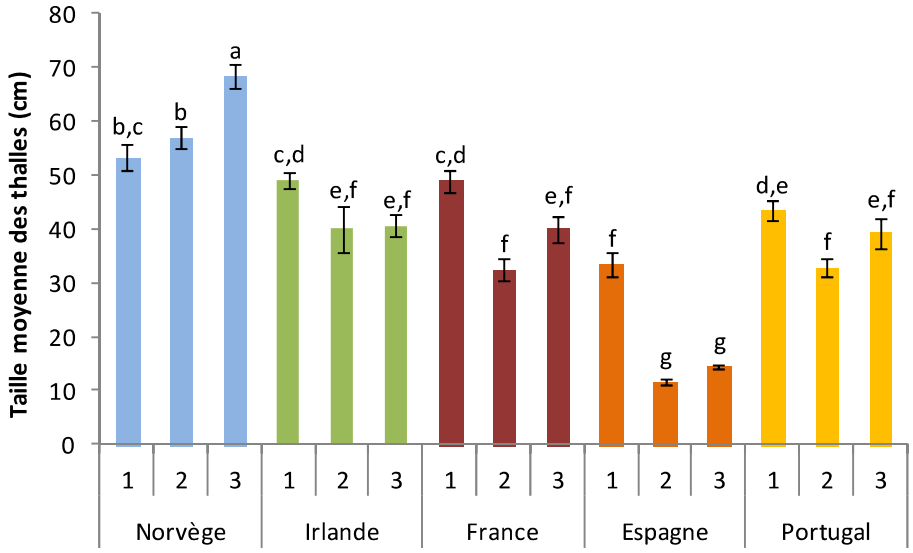


Figure III. 4. Taille moyenne des individus en fonction du site de prélèvement dans les cinq pays considérés.

On observe ici une grande variabilité de la taille moyenne des individus au sein d'un même pays, en particulier en Espagne, où les individus du site 1 sont en moyenne deux fois plus grands que ceux provenant des deux autres sites. Par ailleurs, les individus provenant des différents pays ont des tailles pouvant varier de 10 cm (Espagne) à 70 cm (Norvège). Par ailleurs, l'aspect général des thalles n'était pas du tout le même d'un pays à l'autre. Ainsi, les thalles avaient des couleurs allant du jaune (Norvège) au brun foncé, voire noir (Espagne).

Nous avons étudié la variabilité de la variable 'taille moyenne des individus' en fonction des facteurs 'pays' et 'site' (imbriqué dans pays) et des paramètres environnementaux (ANCOVA présentée au Tableau III.2).

Tableau III. 2. Variabilité de la taille moyenne des thalles de *Sargassum muticum*. Les variables sont étudiées par sites, par pays (le facteur site étant imbriqué dans le facteur pays) et en fonction des paramètres environnementaux tels que la salinité, la température de l'eau, l'intensité lumineuse ou encore la teneur en carbone inorganique. Le test *a posteriori* de Tukey a été effectué lorsque l'analyse de Covariance à deux facteurs (ANCOVA) montrait des différences significatives.

Variable	Test satistique		Facteurs fixes			Co-variables			
			Pays	Site	Pays*Site	CI dissous	Température	Salinité	PAR
Taille Individus	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	899.527	210936.335	76317.392	3.385	0.000	2.180	0.000
		p	*p<0.001*	*p<0.001*	*p<0.001*	0.077	1.000	0.152	1.000

CI, Carbone Inorganique dissous ; PAR, Rayonnement Photosynthétiquement Actif disponible

Ainsi, l'analyse statistique (ANCOVA) ne permet pas de dégager beaucoup de tendances (Tableau III.2). On observe un effet significatif ($p<0.001$) du facteur 'pays' et également du facteur 'site' imbriqué dans celui-ci. Mais aucun autre effet n'est observé. Les paramètres environnementaux testés ne semblent pas avoir une implication dans la variabilité de la taille moyenne des individus. Ceci peut s'expliquer, comme dit plus haut, par le fait que les paramètres environnementaux ne variaient quasiment pas d'un site à l'autre, au sein d'un même pays (Tableau I.3 et Figures I.27 et I.28). D'autres facteurs pourraient expliquer cette variabilité de la taille moyenne des individus, comme par exemple la hauteur d'eau dans chaque site. En effet, l'influence de la hauteur de la colonne d'eau sur la taille des macroalgues brunes a été démontrée (Stiger et Payri, 1999a,b). Ce paramètre environnemental n'a pas été mesuré avec précision lors de l'échantillonnage, mais les observations de terrain permettent de retrouver cette information. En effet, en Espagne, les individus se présentaient sur des rochers affleurant la surface de l'eau de mer (petite hauteur d'eau au-dessus des algues à marée basse) alors que dans les autres pays (Norvège, Irlande, France et Portugal), les individus se trouvaient à une profondeur plus importante dans la colonne d'eau.

Le Tableau III.3 met en avant des corrélations statistiquement évidentes entre les paramètres environnementaux et la taille des individus échantillonnés sur le terrain.

Tableau III.3. Coefficient de corrélation de Pearson (coefficient r) entre les paramètres environnementaux et la taille moyenne des thalles chez l'algue brune introduite *Sargassum muticum*. Lorsque les résultats étaient significatifs à $p<0.01$, ils sont présentés en gras (en rouge lorsque les corrélations étaient négatives et bleu pour les corrélations positives)

	CI dissous	Température	Salinité	PAR
Taille des individus	**-0,49**	**-0,38**	**-0,59**	**0,59**

CI, Carbone Inorganique dissous ; PAR, Rayonnement Photosynthétiquement Actif disponible

En effet, on retrouve une corrélation positive entre le rayonnement lumineux reçu par les algues et la taille des thalles mesurés alors qu'en revanche des corrélations négatives sont retrouvées entre les trois autres paramètres (c. à d. la concentration en carbone inorganique dissous, la température ou encore la salinité) et la taille des individus.

III.3.3.2. Variabilité des glucides et protéines totaux, de la composition en acides gras et en pigments de Sargassum muticum le long du gradient latitudinal

Les résultats de cette étude sur la variabilité spatiale des macromolécules principales : lipides, polysaccharides, protéines, ainsi que du cortège pigmentaire chez *Sargassum muticum* collectée le long du gradient latitudinal, ont fait l'objet de la rédaction d'un manuscrit soumis dans la revue «*Journal of Applied Phycology* » sous la référence suivante:

"Spatial variability of the main macromolecules (lipids, polysaccharides, proteins) and pigment content, from the brown macroalga S*argassum muticum* collected in natural populations within the Atlantic coasts, from Norway to Portugal"

Tanniou Anaëlle, Vandanjon Laurent, Connan Solène, Incera Monica, Husa Vivianne, Le Grand Fabienne, Engelen Ashwin, Walsh Richard, Guerard Fabienne, Bourgougnon Nathalie, Stiger-Pouvreau Valérie.

Les macroalgues représentent un énorme potentiel en tant que ressource industrielle de part leurs diversités en espèces et en composition chimique. En particulier les macromolécules trouvées chez les algues brunes telles que, les acides gras, les protéines, les glucides et les pigments, qui, synthétisés en grande quantité en réponse à certains stress, présentent des activités biologiques intéressantes. Afin de comprendre comment la position géographique des algues, et donc les conditions environnementales, peuvent influencer la quantité et la qualité des composés produits, nous avons étudié les variations latitudinales de ces macromolécules, chez la macroalgue invasive *Sargassum muticum,* au travers de sa distribution sur les côtes atlantiques du Portugal à la Norvège. Cette espèce est tout particulièrement intéressante car elle est présente en grande quantité au printemps et en été sur ces côtes. De plus sa récolte est une des stratégies envisageables pour lutter contre cette espèce invasive. Dans ce but, *S. muticum* a donc été récoltée dans trois sites de 5 pays (Portugal, Espagne, France, Irlande et Norvège). L'étude effectuée consistait à mesurer la quantité de différentes macromolécules par différentes méthodes d'analyses. Le contenu total en polysaccharides et en protéines a été mesuré par les méthodes de Dubois et Bradford, respectivement. La composition en acides gras a été mesurée par chromatographie en phase gazeuse. Et finalement, la teneur en pigments a été quantifiée par HPLC. Les résultats ont permis de souligner les différences entre les populations des extrémités du gradient et les autres. Nous avons aussi démontré les liens existant entre la variabilité biochimique et les paramètres du milieu (tels que la salinité, la température de l'eau ou l'intensité lumineuse).

Spatial variability of the main macromolecules (lipids, polysaccharides, proteins) and pigment content, from the brown macroalga S*argassum muticum* collected in natural populations along the Atlantic coasts, from Norway to Portugal

Tanniou A[1*], Vandanjon L[2,3], Connan S[4], Incera M[5], Husa V[6], Le Grand F[1], Engelen A[7], Walsh R[8], Guerard F[1], Bourgougnon N[9], Stiger-Pouvreau V[1]

[1]LEMAR (UMR 6539 CNRS UBO IRD Ifremer)- Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), Université de Bretagne Occidentale (UBO), Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France anaelle.tanniou@univ-brest.fr

[2]GEPEA (UMR CNRS 6144)-Université de Nantes, Laboratoire GEPEA, CRTT, 44602 Saint-Nazaire, France

[3]Université de Bretagne-Sud, 56321 Lorient, France

[4] Cnam/Intechmer, Digue de Collignon, 50103 Cherbourg, France

[5]CETMAR, 36208 Bouzas-Vigo, Spain

[6]Institute of Marine Research, 5817 Bergen, Norway

[7] CCMAR-*University* of *Algarve, Faro,* Portugal

[8]Irish Seaweed Research Group, Ryan Institute, National University of Ireland, Galway, Ireland

[9]Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA3884, Université de Bretagne-Sud (UBS), IUEM, F-56000 Vannes, France

Abstract

Seaweeds form a gorgeous potential as industrial resource because of their species and chemical composition diversity. Especially, all macromolecules found in brown seaweeds (Phaeophyceae) such as fatty acids, proteins, carbohydrates and pigments, synthesized in large quantity under some types of stress, are known to display interesting biological activities. However, it is unclear how the geographical position and thus environment conditions may influence the quantity and quality of these compounds. In this study we assessed latitudinal variation in those macromolecules in the invasive brown macroalga *Sargassum muticum* across its Atlantic distribution, from Portugal to Norway. This species could be of interest as it can represent high biomass in spring and summer, and because harvesting is advocated as one possible management strategy for this invasive species. For this purpose, *S. muticum* was collected at three sites in each of five countries (Portugal, Spain, France, Ireland and Norway). In this context, the present study was aimed at assessing the quantity of proteins, fatty acids, polysaccharides and pigments thanks to different analysis methods. Total carbohydrate and protein contents were assessed by Dubois and Bradford methods, respectively. The composition in fatty acids was measured by gas chromatography and pigments were quantified using HPLC. The results allowed highlighting the differences between its distributional edge and central populations (countries) and even between sites

within countries. It demonstrated also the biochemical variability in relation with environmental parameters.

Keywords: *latitudinal gradient; polysaccharides; proteins; pigment; lipids; Sargassum muticum*

Abbreviations: **ROS**, *Reactive Oxygen Species;* **FA,** Fatty Acid; **GC,** Gas chromatography; **UFA,** Unsaturated Fatty Acid; **PUFA,** Polyunsaturated Fatty Acid; **SFA,** Saturated Fatty Acid;

1. Introduction

Native of Japan, the brown alga *Sargassum muticum* after its introduction on the European Atlantic coasts has widely spread along these coasts and is presently distributed from southern Portugal to the southern coast of Norway (Plouguerné et al. 2006; Kraan 2008; Engelen et al. 2008; Incera et al. 2009; Olabarria et al. 2009; Le Lann et al. 2012b). *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, currently one of the most available Sargassaceae species on the European shores, was chosen as model organism to study the variation of the biochemical content according to its geographical origin. For this reason, *S. muticum* was collected in three sites of the following five countries, Portugal, Spain, France, Ireland and Norway, with the aim of discovering, if the biochemical composition of this species varies in relation with environmental conditions and/or in relation with colonization dates. We already demonstrated a latitudinal variability of phenolic contents in *S. muticum* with high contents measured at the extremities of the gradient, i.e. in Portugal and Norway, and similar compounds within the gradient (Tanniou et al. 2014). As phenolic contents varied within the gradient, one could hypothetize that other macromolecules susceptible could vary in relation with environmental parameters and/or with the colonization dates of *S. muticum* along Atlantic coasts. Here, we were interested by the variability of total proteins and polysaccharides, together with the composition of fatty acids and pigments in *S. muticum*. This species represents a large sustainable biomass and then a viable biotechnological asset in the European resource development programs. Consequently, this species can be a very interesting source of new substances for different industries. Moreover, our study represents an interesting monitoring for fundamental research in studying the chemical plasticity of the introduced *S. muticum* along the latitudinal gradient. This present study completes then a previous study presenting the variability of active interesting phenolic compounds (Tanniou et al. 2014).

From a general point of view about molecules produced by algae, brown seaweeds contain many polymeric carbohydrates, wich could represent, in some species, more than 60% of the dry weight (Marinho-Soriano *et al*., 2006; Rioux *et al*., 2007). So, we attribute them many properties: anti-viral, antioxidant, anti-inflammatory (Stengel *et al.*, 2011), they are thus

used in the medical or cosmetic industry, in food industry for their gelling properties (Michel *et al*., 2006 ; Rinaudo, 2007) or in agriculture for their capacity to retain water (Stengel *et al*., 2011). Concerning proteins, high contents have been reported in seaweeds, in particular in red algae (Fleurence 1999). Macroalgae can then be a natural protein source for the food industries and almost for pharmaceutical industries thanks to their biological activities (Harnedy and FiztGerald, 2011; Stengel et al. 2011). Concerning fatty acids, low contents have been reported in seaweeds (El-Naggar 1994; Fleurence 1994; Kumari et al. 2009). These fatty acids possess good anti-viral properties (Sánchez-Machado *et al*., 2004) and can also be a source of essential fatty acids in human food. Concerning pigments, they are an integral part of the pigments/proteins complex (Light-Harvesting Complexes) forming the photosystems. These are involved in the primary bioenergy process of photoautotrophes: photosynthesis. Pigments present in majority in brown algae are chlorophyll a (Chl a) and c (Chl c), fucoxanthine, violaxanthine and ß-carotene (Alberte *et al.*, 1981; De Martino *et al*., 2000). For example, fucoxanthine is known for its numerous pharmaceutical activities as for example its antioxydant (Yan *et al.,* 1999), anti-obesity (Maeda *et al.,* 2007; Jeon *et al.,* 2008) and anti-diabetic activities (Maeda *et al.,* 2007).

Many studies were interested in the chemical compound variability, within a same species, to be able to differentiate them by their geographical origins (Black 1948; Hurtado et al. 2011; Plouguerné et al. 2006) or to study their adaptability in the colonized environment. Macromolecules present in seaweeds, and also their pigment composition, are very sensitive to environmental conditions such as the variations of climate, light intensity, temperature … (Stengel et al. 2011). Thus, the present study was aimed at assessing the quantity of proteins, fatty acid, polysaccharides and pigments in individuals of *S. muticum* settled in five countries along a latitudinal Atlantic gradient from North (Norway) to South (Portugal) at two levels: between the different countries and between sites within each country. Even if numerous studies are more interested by the nutritional and/or industrial, medicinal potential of seaweeds (Stengel at al. 2011), here, we were interested in understanding how this species changes its biochemical composition according to the environment. However it is important to remind that there are various scales in environmental variations, so, the biochemical profile of a seaweed is able to vary during the day, and/or sometimes within only a few hours (Lopez-Figueroa, 1992; Stengel et al. 2011).

2. Materials and methods

2.1. Algal material

Thalli of *Sargassum muticum* were collected between March and May 2011 in three sites of five countries along a latitudinal gradient in Europe. Samples were collected, from South (March) to North (May), in respectively Spain, Portugal, Ireland, France, and finally in Norway. The sampling period was chosen according to the physiological state of the algae in all countries, as for these months in each sampled countries, *Sargassum muticum* was still immature.

The collection was made at low tide on semi-exposed or exposed sites in every country excepted Norway. Indeed, *Sargassum muticum* being installed there only in the subtidal zone, it was difficult to find three exposed sites in presence with the species; one site was thus "sheltered". The hydrodynamic nature of sites was determined according to the ground topology and the present flora during the sampling. Other environmental parameters, such as sea water temperature, photosynthetically available radiations and water salinity were determined thanks to the measurements made by satellites within the framework of the AQUA Modis and Aquarius missions of the NASA (Strange National Aeronautic and Administration). These data were presented as data ranges in Tanniou et al. (2014) for the considered sampling period depending on countries.

During collection, only the apical and median parts of the thalli were retained and the holdfast was left in place to allow regrowth and thus minimize collecting impact. Immediately after collection and epiphyte removal, seaweeds were washed first with filtered seawater then with distilled water in order to get rid of residual sediments and salts. The cleaned algal materials were then surface dried with blotting paper towel, chopped into fragments, freeze-dried, powder reduced with a Waring Blender and finally sieved at 250 µm.

2.3. Total proteins content

The total protein content was determined according to the colorimetric method of Bradford (1976), based on the change of absorbance (measurement at 590 nm), shown by the change of the Coomassie blue color after complexation with aromatic amino acids and hydrophobic residues present in several proteins. This protocol was adapted for this utilization on microplates. The change of absorbance is proportionate to the quantity of bound colouring agents, thus indicating the proteins concentration in the sample. Contrary to the other methods of measurement of proteins, Bradford's method is less sensitive to the interferences by diverse present agents in the samples of protein. It is however allocated by cleaners, pH modifiers, and gives positive results also to the hydrosoluble polyphenols of high molecular weight (tannins).

A calibration range was prepared with bovine serum albumin (BSA) going from 0 to 1 mg. mL^{-1}. The alkaline biomass hydrolysis was made in a 95°C water bath during 6 min after the addition of 1 mL of NaOH 2N on 200 mg of algal powder. After cooling under water, the hydrolysat was neutralized by adding 1 mL of HCl 1.6 N. The cellular fragments are eliminated by centrifugation 10 min at 6000g. After that, 50 mg of PVPP were then added to the samples in order to eliminate phenolic compounds traces. After centrifugation, the supernatant was kept and diluted at the desired concentration. The measurment consists in mixing, on the microplate, 10 µL of a prepared diluted sample or standard with Bradford reagent. Plates were then incubated during 15 min. At the end, the optical density was quickly measured at 590 nm (stable tint during approximately 30 min) against a control without extract realized in the same conditions. Proteins concentration (BSA equivalent) was expressed as % of dry weight of the algae (%DWalgae).

2.4. Total pigment content

For the extraction of pigments, 50 mg of powdered alga were subsequently extracted twice with 1 mL of a mixture of acetone/water (90:10, V/V), at 4°C and under agitation. The first extraction lasted 30 minutes, the second 12 hours. The two extracts were then pooled, centrifuged at 5 000 rpm during 5 minutes. The resulting supernatant was filtered using a 0.45 µm Nylon membrane (Millipore). Prior to injection in the HPLC system, 150 µL of the filtered extract were mixed with 50 µL of buffer (ammonium acetate aqueous solution at 0.5M, pH 7.2).

These samples were analyzed using a HPLC system by UV-Visible detection. For this purpose, a Waters HPLC system equipped with a Waters 717 Plus autosampler, a Water Controller pump and a Photodiode Array Detector were used. The wavelength range of the detector was set at 210-700 nm. All pigments were separated following the method described by Wright et al. (1991) modified by Bidigare et al. (2005). Each analysis consisted in the injection of 10 µL of sample. Molecules were separated using reverse-phase chromatography with a Zorbax Eclipse XDB-C18 column (4.6×150 mm; 5 µm; Agilent Technologies) equipped with a C_{18} guard cartridge (SecurityGuard, Phenomenex) and maintained at 40°C. A ternary mobile phase was used: eluent A was constituted by 80 % methanol, 20 % ammonium acetate buffer at pH 7.2, and BHT at 0.1 g/L; eluent B was constituted by 87.5 % acetonitrile, 12.5 % water, and BHT at 0.1g/L; eluent C was pure ethyl acetate. The gradient of elution is indicated in Table 1. Several concentrations of chlorophyll a, chlorophyll c, fucoxanthin, violaxanthin, zeaxanthin and beta-carotene (standards furnished by DHI, Denmark) were injected in order to get correspondence between area of the peaks and quantity of pigments. After peaks attribution and integration, according to standards, Pigments' concentrations were expressed as % of dry weight of the algae (%DWalgae). In addition, two ratios: zeaxanthin/violaxanthin and Chlorophylls/Carotenoids, were calculated.

Table 1: Solvents gradient used during HPLC analysis

Time (min)	Flow	%A	%B	%C	Stage
0	90	10	0	1	Injection
1	0	100	0	1	Linear gradient
11	0	78	22	1	Linear gradient
27,5	0	10	90	1	Linear gradient
29	0	100	0	1	Linear gradient
36	90	10	0	1	Equilibration

2.5. Composition of fatty acids (FA)

2.5.1. Lipid extraction

To improve lipid extraction efficiency, lyophilized biomass was first rehydrated with 400% of distillated water (w/w). Macroalgae lipid extraction was then conducted in 6 mL of a chloroform/methanol mixture (2:1, v/v). To ensure a complete lipid extraction, vials were sonicated in a water bath and maintained 2 h under agitation in darkness. After adding 0.01%

(w/w) of BHT as antioxidant, lipid extracts were stored at −20◦C under nitrogen before analysis.

2.5.2. Gas Chromatography (GC) analysis for the FA composition

Lipid extract aliquots (1/10) were evaporated to dryness under nitrogen. After adding 800 µL of BF_3 and tricosanoic acid as internal standard, aliquots were transesterified for 10 min at 100°C. After cooling and adding 800 µL of hexane, the organic phase-containing FA methyl esters were washed three times with 1.5 mL of hexane–saturated water. FA methyl esters were recovered and analyzed in a GC-FID 6890 (Agilent) equipped with an on-column injector and a flame-ionization detector. FA methyl esters were identified by means of a standard 37-component FAME mix and other known standard mixtures from marine algae. FA contents were expressed as the molar percentages of total FA content.

2.6. Total carbohydrate content

The total saccharides content was made according to the phenol colorimetric method of Dubois et al. (1956) and miniaturized for microplates reading. The carbohydrate hydrolysis was realized in presence of hot sulphuric acid. The obtained monosaccharides were dehydrated and re-arranged to form furfural and/or hydroxy-methyl furfural. These compounds appear yellow by condensation with the phenol. The used reagents were a 50 $g.L^{-1}$ aqueous solution of phenol and a 98 % concentrated sulphuric acid solution.

Samples were centrifuged (10 min, 6000 rpm), the obtained pellet was then washed with some demineralized water. After a second centrifugation (10 min, 6000 rpm), the obtained pellet was diluted at the desired concentration (lower than 1 $g.L^{-1}$). A calibration range was prepared with glucose solutions between 0 and 0.4 $mg.mL^{-1}$.

Measurements consisted in mixing 500 µL of diluted sample with 500 µL of solution of phenol and 2.5 mL sulphuric acid in glass test tubes. The not mixed solutions were incubated during 10 min at room temperature before being shaken in the whirlpool (10 s, 3000 rpm) then incubated 30 minutes in a 35°C water-bath. To finish, 200 µL of each sample were quickly added on microplates. The optical density was immediately measured at 492 nm (stable tint during several hours) against a control without extract realized in the same conditions. Total carbohydrate concentration (Glucose equivalent) was expressed as % of dry weight of the algae (%DWalgae).

2.7. Statistics

Chemical analyses were carried out on triplicates, and results were presented as mean values ± standard deviation (SD). All statistical analyses were made using the Statistica 8 (StatSoft ®) software for PC. Homogeneity of variance was tested with the Brown-Forsythe test at the 0.05 risk error. Data which did not satisfy the criteria of normality and homoscedasticity for parametric tests were square root transformed. Afterwards, one way nested ANOVA, with sites nested within countries, were performed on the data. When ANOVA demonstrated significant difference, a post hoc Tukey HSD test was carried out to know which means contributed to the effect. A principal components analysis (PCA) was used to illustrate pigment composition according to the geographical origin of samples. PCA

test was performed on the 45 samples (triplicate of the three sites from the five countries). Variables used to perform the PCA were the six following pigment concentrations: Chl a, Chl c2, β-caroten, violaxanthin, zeaxanthin and fucoxanthin.

Chemicals

All reagents used in the experiments were of analytical grade and obtained mostly from Sigma. Solvents used for extraction of algae samples were purchased from Fisher Scientific. Water used was of Millipore quality.

3. 3. Results

3.1. Fatty acid composition

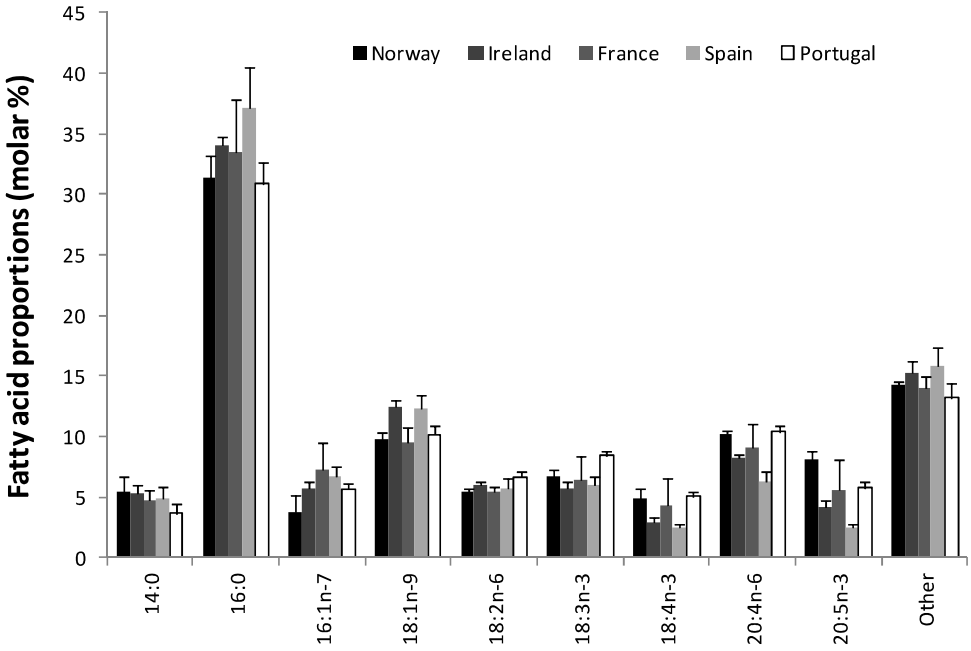


Figure 1. Fatty acids proportion in samples according to the geographical origin of Sargassum muticum (Means +/- SD).

Table 2. Means for each classes of Fatty acids (SFA: Saturated Fatty Acid; MUFA: Mono Unsaturated Fatty Acid; PUFA: Poly Unsaturated Fatty Acid; UFA: Unsaturated Fatty Acid)

	Norway	Ireland	France	Spain	Portugal
Total SFA	36.71	39.30	38.35	42.09	34.53
Total MUFA	13.67	18.25	16.78	19.04	15.88
Total PUFA	35.36	27.18	30.83	23.07	36.37
Total 3	19.67	12.87	16.34	10.99	19.28
Total 6	15.70	14.31	14.49	12.08	17.09
n-3/n-6	1.25	0.90	1.13	0.91	1.13
Total UFA	49.03	45.42	47.61	42.11	52.25

Among the different quantified FA, unsaturated FA (UFA) are present in greater quantity (47.29% on average) than saturated FA (SFA) (38.20% on average, Table 2). SFA are representing in great majority by myristic (*14:0*) and palmitic (16:0) acids (Figure 1). The palmitic acid is the most abundant measured FA whatever the concerned country with a maximum of 37.20 % for Spain and 30.84 % for Portugal. It represents, on average 33.39 % of the measured FA. Myristic acid represents on average 4.81 % of the measured FA. The content in myristic acid trends to decrease with the southern latitude of the collection sampling (low values determined in Portugal, Figure 1). The content of myristic acid is the most important in individuals collected in Norway where it represents 5.39 % of FA and is the lowest in individuals settled in Portugal where it represents 3.69 % of the measured FA. High contents of palmitic acid were measured in *Sargassum muticum* populations (Figure 1), with individuals from Spain producing more content (37.20 +/- 3.32 molar%, Figure 1). Generally speaking UFA are, on average, the most abundant at the gradient extremities (Table 2) with individuals from Norway and Portugal producing respectively 49.03 % and 52.25 % on average.

The measured unsaturated fatty acids (UFA), most abundantly found are in the first place oleic acid (18:1n-9) (with a maximum of 12.44 and 12.38 % for individuals collected in Ireland and Spain respectively and a minimum of 9.46 % for France) and secondly arachidonic acid (20:4n-6) (with a maximum of 10.17 and 10.42 % for Norway and Portugal respectively and a minimum of 6.28 % for Spain). The not identified FA (noted as “other” on Figure 1, represents more than 13 % of measured FA). Furthermore, when interested in ratio between UFA and SFA in the particular case of Spain, one should note that UFA was almost equal to SFA (42.11 and 42.06 %, respectively) (Table 2).

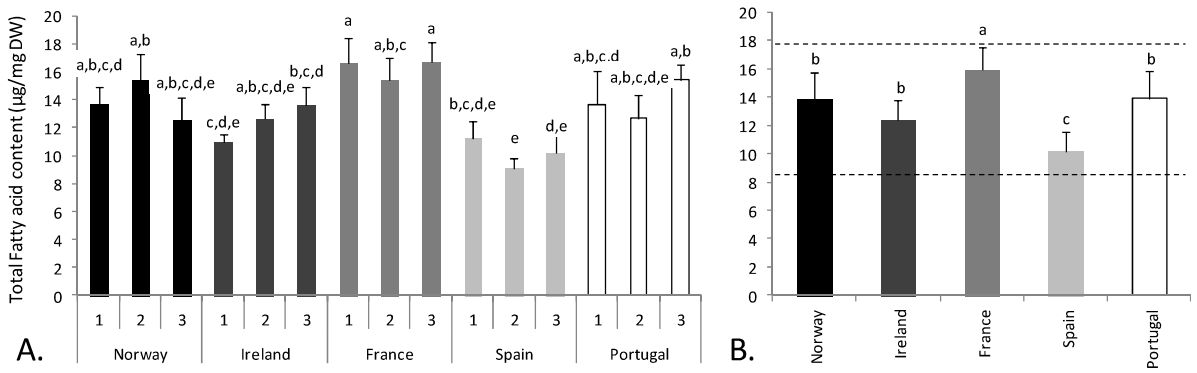


Figure 3. Total fatty acid content in the brown macroalga S. muticum samples providing from 15 locations (Means +/- SD). For each fatty acid analysis, values sharing a common letter in parentheses were not statistically different according to Tukey's HSD test. A. Mean value depending on sites by country. B. Average content by country.

The FA content varies in an important way within a same country, especially in Ireland and in Spain (Figure 3A): a difference of more than 19 % between the minimum (10.99±0.49 and 9.10±0.72 µg.mgDW^{-1} for Ireland and Spain, respectively) and the maximum measured value (13.61±1.26 and 11.27±1.21 µg.mgDW^{-1} for Ireland and Spain, respectively). If we look at the total content by country (Figure 3B) we can see that samples resulting from France are the richest in FA, then comes Norway, Ireland and Portugal and finally Spain which contains the least fatty acids (16.21 ± 1.54 and 10.01±1.38 µg.mgDW^{-1} for France and Spain, respectively).

3.2. Total carbohydrate content

The content in total carbohydrates in *Sargassum muticum* varies in an important way within a same country (Figure 4), as observed in France or in Portugal. For these countries, we have 51 and 60 % difference respectively between the minimum (4.29±0.80 and 5.57±1.54 % DW, respectively) and the maximum measured value (10.82±1.07 and 11.48±0.27 % DW, respectively).

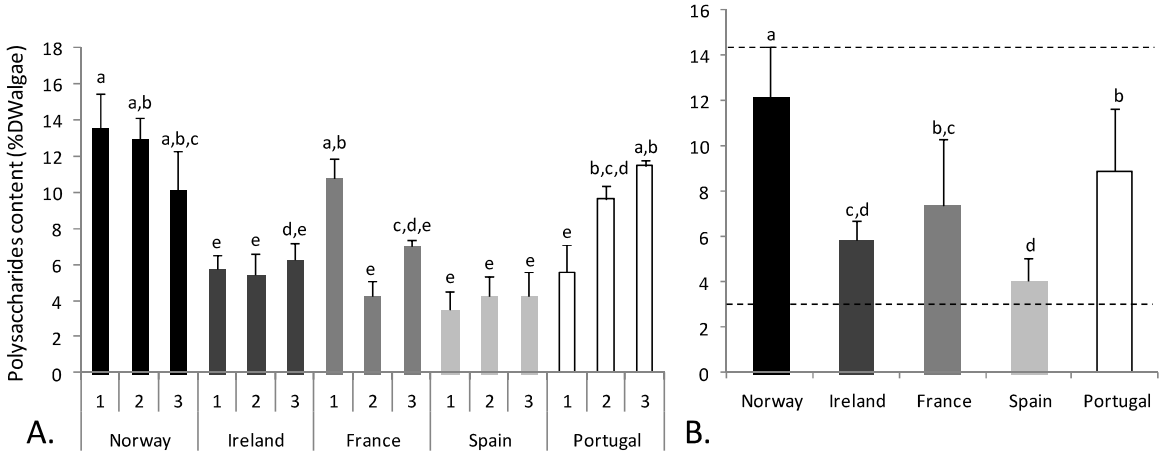


Figure 4. Total carbohydrate content in the brown macroalga S. muticum samples providing from the 15 locations (Means +/- SD). For each content analysis, values sharing a common letter

in parentheses were not statistically different according to Tukey's HSD test. A. Mean value depending on sites by country. B. Average content by country.

If we look at the total content by country (Figure 4) one could note that samples resulting from gradient extremities, i.e. from Norway and Portugal, are rich in polysaccharides (12.21±2.20 and 8.90±2.76 % DW, respectively), followed by France (7.39±2.92% DW) and finally by Ireland and Spain which contain less sugars (5.84±0.87 and 4.01±1.04 % DW for Ireland and Spain, respectively).

3.3. Total Protein content

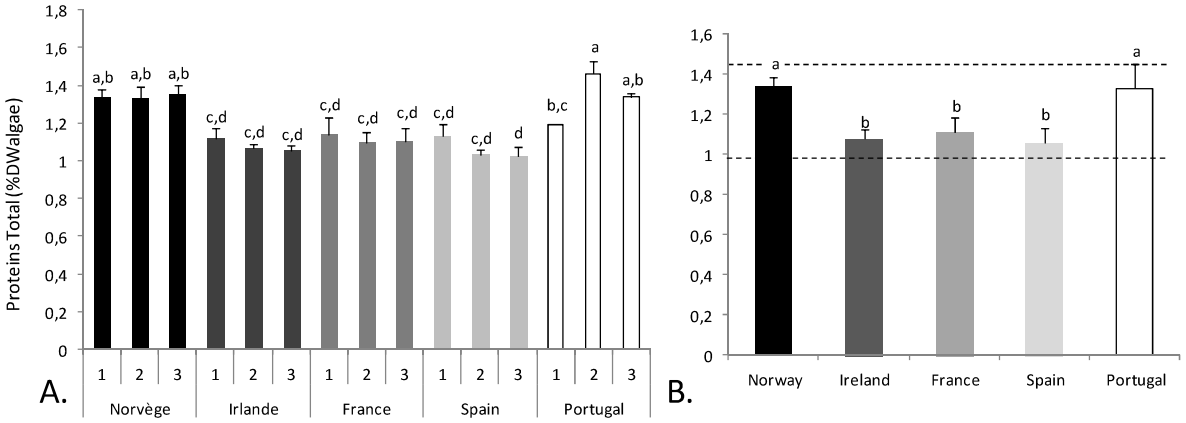


Figure 5. Total protein content in S.muticum samples providing from the 15 locations (Means +/- SD). For each pigment analysis, values sharing a common letter in parentheses were not statistically different according to Tukey's HSD test. A. Mean value depending on sites by country. B. Average content by country.

Conversely to other macromolecules, Figure 5 shows that protein contents vary little within a same country and also between the five countries. On the other hand, we still find the same tendency for the gradient extremities where protein contents are most important with 1.34±0.05 % DW produced by individuals from Portugal and 1.33±0.12 %DW produced by individuals from Norway. At an intermediate position in Europe, individuals from the three other countries produced similar protein content around 1.1 %DW (Figure 5).

3.4. Pigment composition

The chromatographic method clearly separated investigated molecules, with chlorophyll c2 eluted first and β-caroten arriving at the end of the HPLC analysis (Figure 6). Six of them were studied: chlorophylls (a et c2) visible on the chromatogram with good intensity and carotenoids (β-caroten) including numerous xanthophylls (i.e. violaxanthin, antheraxanthin, zeaxanthin and fucoxanthin) with fucoxanthin present in an important quantity.

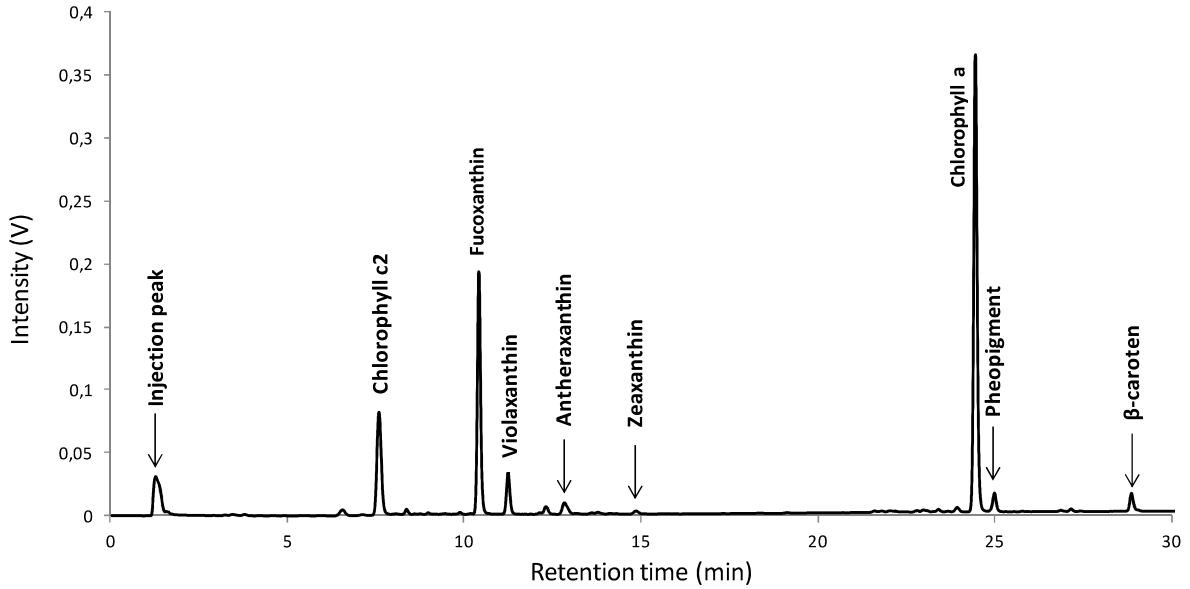


Figure 6. Chromatogram of a Sargassum muticum sample revealing the presence of nine pigments (detection at λ=435nm)

In all tested samples, major pigments were chlorophyll a, fucoxanthin, and chlorophyll c. Their maximal mean contents reached 0.17, 0.08 and 0.02% DW, respectively (Figure 7 A). Maximal values were always observed in samples providing from Spain. Violaxanthin, β-caroten and zeaxanthin contents were characterized by lower values, under 0.01 % DW. A possible evolution of pigment contents according to latitudinal position of samples could be advanced from results presented in Figure 7B. Indeed, PCA shows that the geographically close samples present also close pigment compositions. For example, the pigment compositions of samples resulting from Norway and Ireland are statistically confused as for samples resulting from France and Portugal. Samples from Spain present the most original pigment composition and are statistically very distant from those of other countries. Indeed individuals contain more fucoxanthin and β-carotene than the other samples (0.10±0.03 and 0.01±0.01 %DW for fucoxanthin and β-carotene, respectively) and also less chlorophyll (0.14±0.19 %DW) (Figure 7).

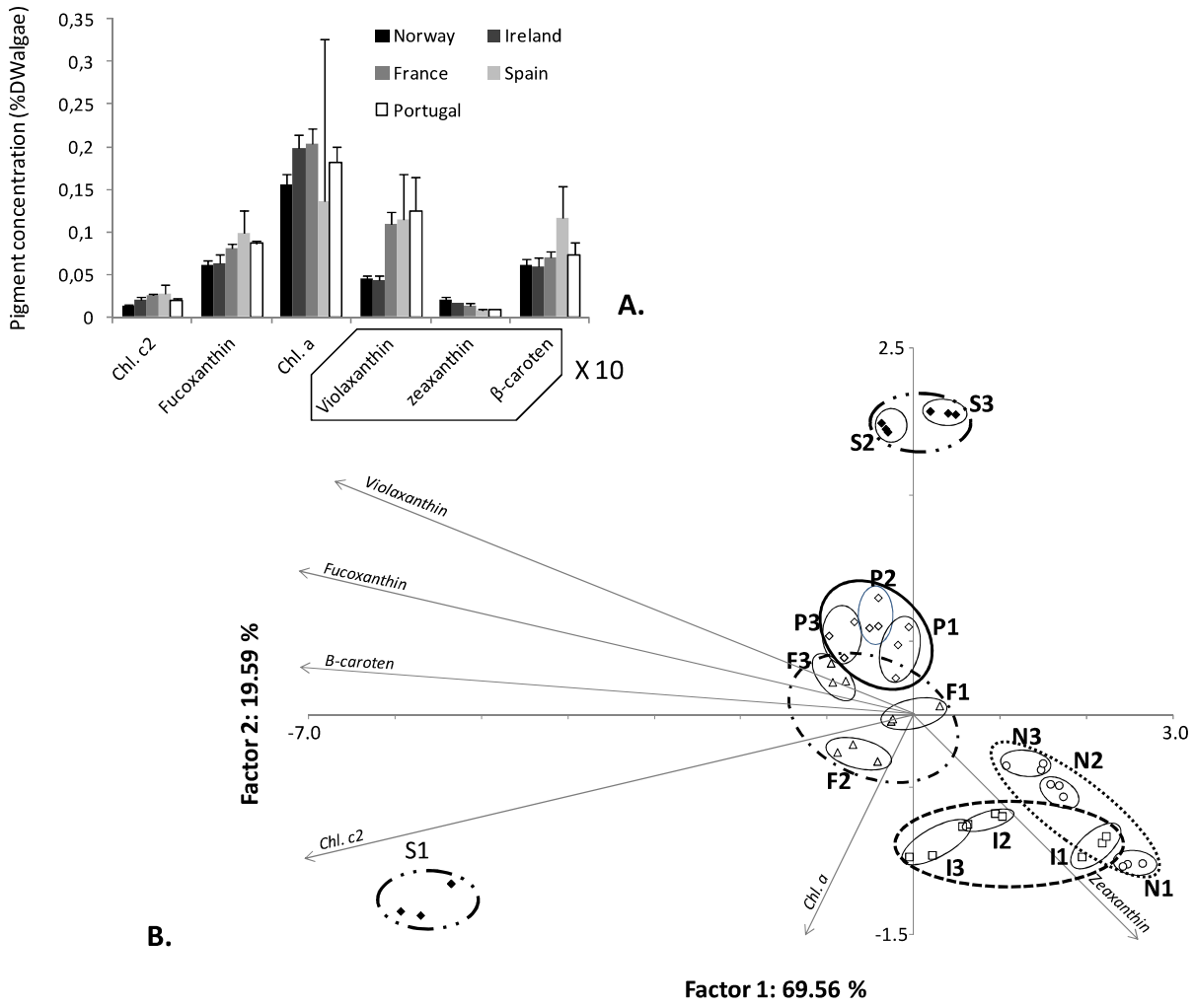


Figure 7. Composition of pigments in the brown macroalga *Sargassum muticum* collected along a latitudinal gradient from Portugal to Norway. A. Pigments contents in *S. muticum* from the fifteen locations (Means +/- SD). For each pigment analysis, values sharing a common letter in parentheses were not statistically different according to Tukey's HSD test. For Violaxanthin, zeaxanthin and β-caroten, the scale is not similar, all values were multiplied by 10. B. Principal component analysis (PCA): projection of 80 extractions combinations on the Factor 1 vs. Factor 2 planes. N:Norway; I:Ireland; F:France; S:Spain and P:Portugal with 1,2 and 3 the three sites sampled per country.

In addition, still concerning Spain, contrary to the other countries, a big variability between sites can be noticed: site 1 is very distant from sites 2 and 3 (Figure 7 B). For other countries it is easy to make regroupments, i.e. sites inherent in each country have a very similar pigments composition.

Ratios between the various pigments, i.e. the two xanthophylls zeaxanthin/violaxanthin and chlorophylls (a and c2) /carotenoids, are presented on Figure 8. The first ratio indicates that northern gradient (i.e. Norway and Ireland) presents a raised zeaxanthin/violaxanthin ratio (with on average a ratio for the two countries around 0.41) while for southern countries (i.e. France, Spain and Portugal) the ratio is lower with on average a ratio around 0.09. The second ratio is very important in Ireland (2.93), followed by both Norway and France (mean for the two countries: 2.30) and less important in the extreme

South of the gradient (mean for Spain and Portugal: 1.60). The calculation of these two ratios highlights the important differences of pigment behavior between northern and southern countries along the latitudinal gradient.

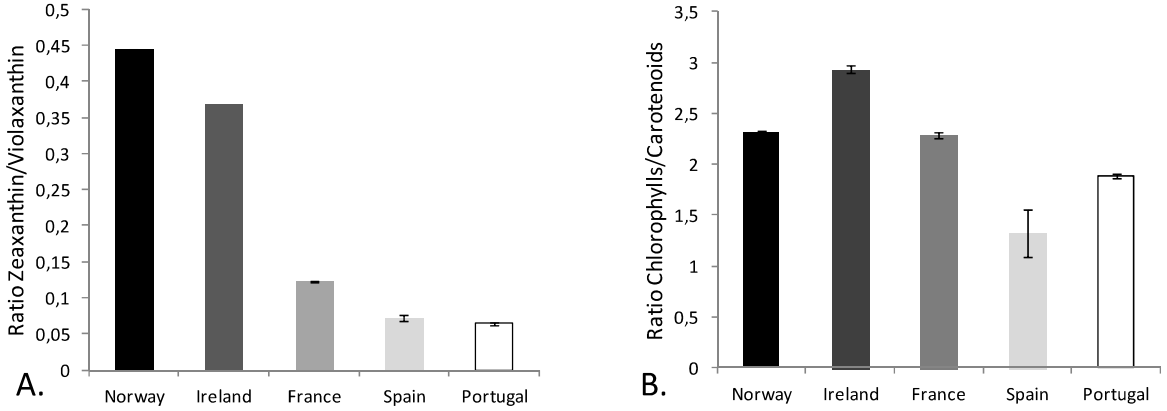


Figure 8. Pigments composition of individuals of the brown macroalga *Sargassum muticum* collected along a latitudinal gradient, from Portugal to Norway. A. ratio zeaxanthin/violaxanthin B. ratio Chlorophylls/Carotenoids (Chlorophylls: a and c2; Carotenoids: Viola, zea, fuco and B carotene).

4. Discussion

Our results highlight the chemical plasticity of *Sargassum muticum* in terms of fatty acid and pigment content, together with total protein and carbohydrate contents.

4.1. Fatty acid variations

Macroseaweeds contain generally few lipids, with contents varying from 0.13 to 3.50% DW according to the species (El-Naggar 1994; Fleurence 1994; Kumari et al. 2009), with species producing especially unsaturated fatty acids (Fleurence 1994). In our considered sampling period (i.e. spring 2011), for every countries, UFA > SFA. Whatever the considered site and country the most abundant FAs were: 16:0, 18:1, l8:3, 20:4 and 20:5 with a prominence of palmitic acid (16:0). Similar results were obtained from other studies on brown seaweeds (Takagi et al. 1985 ; Sukenik at al. 1989 ; Fleurence 1994 ; Napolitano 1994 ; Stengel et al. 2011 ; Gerasimenko et al. 2010). The sources of variability which may affect the lipid content are numerous, we can quote for example: seasons, location, growth conditions, light intensity, temperature and heavy metal concentrations (Harwood and Jones 1989 ; Al-Hasan et al. 1990; Jones and Harwood 1993 ; Meiser et al. 2004; Terasaki et al. 2009 ; Stengel et al. 2011). The predominant monounsaturated FA is the oleic acid (18:1 w9), it was shown that its quantity tended to increase with irradiance and/or temperature (Kumari et al. 2009); consequently, its quantity often increases in summer (Gerasimenko et al. 2010). It is also the UFA often found in the most important quantity (Gerasimenko et al. 2010) which is the case here. In our study, oleic acid is the most important in Ireland and Spain samples. This could be attributed to, a particularly brightened up spring in 2011 for Ireland, and to

important seawater temperatures and light intensities all year long for Spain. However, the seawater temperatures at the sampling period (i.e. 12-14°C in these two countries) were average and available radiations were very low compared with those found in the other countries (i.e. 32.5 and 22.5 Einstein.m^{-2}.$jour^{-1}$, respectively). It is however difficult, even if we notice effectively a change in the proportions of each extracted FA as well as in the total quantity of FA, to attribute these differences only to the geographical position of our samples. It was indeed demonstrated that these changes could singularly depend on the season (Honya et al. 1994 ; Kim et al. 1996 ; Sanina et al. 2008), and thus be relatively fast. This is more a matter of regulation and not a real environmental adaptation. For every country excepted Portugal, at the sampling period (spring, 2011), SFA >PUFA and SFA<UFA; however, other studies showed that in spring and summer PUFA > SFA and UFA > SFA (Gerasimenko et al. 2010), even if the more we go towards summer period, the more the SFA/PUFA ratio decreases. It could be understandable, without taking into account other parameters, by an abnormally hot spring in 2011. Besides, SFA are often more concentrated in hot waters (Kumari et al. 2009) while more PUFA were found in cold waters (Kumari et al. 2009). It does not seem to be consistent with our results; indeed, maximum SFA is found in Spain (water temperature of 12-14°C) and maximum PUFA in Portugal where the water is the hottest (18-20°C). Also, certain authors showed that seaweeds were capable of accumulating PUFA in low luminous intensity conditions (Napolitano 1994; Sukenik et al. 1989). Indeed in our study, PUFA is the most important in countries subjected to strong luminous intensities, i.e. Norway and Portugal where the available radiations were superior to 40 Einstein.m-2.jour-1 at sampling period. PUFA are the most important at gradient extremities and the least in Ireland and Spain. Nevertheless, it could be understandable for Norway by its particular sunshine periods during the sampling period: perpetual day. In Ireland, in spite of a less important sunshine period all year long, this one undergoes few variations. In Spain the luminosity remains rather important during the year explaining this minimum of PUFA. Besides, ω-3 FA are always more important at gradient extremities and in France. Gerasimenko et al. (2010) showed that FA 18:4 and 20:5 tended to increase with rather low light conditions. A possible explanation of the visible tendencies, which differs from the literature, would be that the variations in the lipid contents are rather fast and answer finer environmental variations, such as daily variations for example.

4.2. Total carbohydrate content

Numerous types of polysaccharides exist in seaweeds. In brown seaweeds, they constitute the main reserve; as laminaran form in particular (Stengel et al. 2011). The main source of variation for the total quantity of produced sugars is essentially seasonal and/or bound to the seaweed growth. Indeed, mannitol and laminaran contents are especially more important in the mature thalli (Stengel et al. 2011). Mannitol is also accumulated in case of salt stress (Bäck et al. 1992). Carbohydrates are subjected to important annual variations and their increase is so often connected to water temperature and/or luminosity reduction; which explains carbohydrates increase in winter in some algal species (Mouradi-Givernaud et al. 1992 ; El-Naggar 1994). This phenomenon is partially understandable by a need to mobilize carbon resources during this period. In our study, this hypothesis could come true for Norway because of the greater amount of carbohydrates in the samples and of colder water

temperatures. It remains coherent for Ireland, France and Spain where the water is for an average temperature bordering 12-14 °C. However, the case of Portugal was there still very surprising given that neither the water temperature nor the luminosity were low this time of year while it is there that we found most polysaccharides after Norway.

4.3. Total protein content

During our study two different methods for the proteins content determination were tested: Bradford and Lowry methods; only the results of the Bradford method is presented here. Lowry's method is not totally reliable because of the possible interferences due to reagents. Furthermore, it requires more implementation time. The range standard necessary for the concentration determination of an unknown solution is delicate to realize. Bradford's method has limits because it is linear only on a narrow interval, typically from 2 to 120 $\mu g.mL^{-1}$, which makes necessary preliminary dilutions of the sample before analysis. Furthermore, amino acids, peptides and proteins of low molecular weight (<3000 Da) are not detected by this method. As for Lowry's method, reagents react positively to tannins in solution. For that purpose, the quantification of total soluble proteins was preceded by a stage of fixation of these tannins by means of PVPP (PolyVinylPolyPyrrolidone) as previously recommended by Koivikko (2008).

Macroalgae are known for their high contents in proteins (Fleurence 1999). However, the brown seaweeds are certainly the ones which contain least; indeed, according to Harnedy and FitzGerald (2011), algae would contain only 3-15 % of their dry weight. In our study, the protein contents were even lower than 1.5 % DW. The protein contents seem to vary a little within a same country and also between countries. Nevertheless, the sources of variations of the protein contents are numerous: seasons, nutriment resources and salinity in particular (Stengel et al. 2011). Sites localized close to strongly anthropological zones (harbour zones) contain also more proteins (case of the site 1 of Spain for example). The most important protein content in Norway can be also understandable by the strongest content in inorganic carbon in Northern Europe waters at this period of the year (satellite Aqua MODIS, NASA; Tanniou et al. 2014). Another parameter allows to explain these tendencies, indeed certain authors (Gorham and Lewey 1984 ; El-Naggar 1994) showed that species from the genus *Sargassum* contained more proteins in winter and at the beginning of spring, in connection with the high level of nitrogen in the seawater. As for other one studied macromolecules, the problem is that these variations can be visible in very small scales, as within a day (López-Figueroa, 1992; Sampath-Wiley et al., 2008). The negative role of salinity on the proteins production by brown seaweeds in summer was advanced by Marinho-Soriano et al. (2006) in particular on *S. muticum*. In our study, Spain and Portugal present the most important salinity (36 and 37 psu, respectively). Here, it does not seem to explain the observed variations, the seaweeds resulting from Portugal being particularly rich in proteins. This explanation might be appropriate for Norway where the low salinity (34 psu) could be favorable to the proteins production. Now, it seems difficult to draw general conclusions on the effect of the environmental parameters on the production of proteins by *S. muticum*.

Some authors highlighted a negative effect of the seawater temperature on the thallus growth and thus on the production of seaweeds in a general way (Davison, 1991; Pörtner *et*

al., 2006 ; Padilla-Gamino and Carpenter, 2007 ; Staehr and Wernberg, 2009). In our study the measurement of the size of individuals showed a big heterogeneity between countries as follow: *S. muticum* collected in Spain, possessing the smallest thalli has also the lowest proteins and carbohydrate contents.

4.4. Pigment composition

The pigment content directly depends on the light conditions in countries. Studies showed that the total contents in pigments were more important in thalli exposed to low light intensities, as seaweeds from Arctic zones, from in-depth or simply during winter (Ramus et al. 1976, 1977 ; Aguilera *et al*. 2002) in order to increase their light absorption capacity. On the other hand, in case of strong illumination the quantity of pigments decreases to avoid photodamage or photoinhibition due to over excitation of photosystems. Algae can set up, thanks to certain pigment, a strategy of photo-protection allowing to regulate the photosynthesis yield and so to protect photosynthesis reaction centers against photo-oxidation, as the settlement of the xanthophylls cycle which is taking place in plasts from brown algae (Demmig-Adams and Adams 1992).This one thus exercises an effective regulation, producing zeaxanthin (de-epoxidation of violaxanthin to zeaxanthin (Ruban et al. 2007) when it is necessary to dissipate an energy excess, but by eliminating it in radiance weakness conditions when PS needs more energy (epoxidation of zeaxanthin to violaxanthin). Demmig-Adams et al. (1996) showed for plant leaves that the ratio Chlorophylls/carotenoids decreases in case of light overexposure, thus highlighting an important variation of the relative proportions of the various carotenoids, with a strong increase of zeaxanthin, violaxanthin, and antheraxanthin proportions, which contributes to the cycle of xanthophylls. Our study validates this information for only two countries. Thus, chlorophylls/carotenoids ratio is the smallest in countries where radiations are supposed to be the most important (Spain and Portugal). But environmental data shows that in Spain radiations are not very high. However, in our study, we can see that the ratio zeaxanthin/violaxanthin is more important for northern samples where light intensities are the lowest and lower in southern countries (France, Spain, Portugal) where luminosity is supposed to be more important. Apart for Spain, where the light intensity at the sampling time was rather low and for which it was logical to find more violaxanthin. For other countries, variability could be dependent on general usual seaweed environmental conditions. Indeed, as it was demonstrated for the seawater temperature, i.e. seaweeds from colder environments reach higher photosynthetic yield at low temperatures, while seaweeds native from warmer one exhibit superior photosynthetic rate at higher temperatures. Thus, their optimal photosynthesis temperature is the optimal temperature of growth (Davison 1987; Kuebler et al. 1991; Eggert and Wiencke 2000). It is possible, that the seaweed produces more zeaxanthin not in answer to an important light intensity but to a luminous intensity more important than usually (i.e. very sunny spring in 2011 and/or exit of the perpetual day for Norway for example). In addition, high violaxanthin quantities occurring in France, Spain and Portugal could be considered as a potential zeaxanthin pool which could be used as a way to dissipate energy in case of extreme light conditions in countries where the light intensity is usually high. Finally, Gerasimenko et al. (2010) showed that the quantity of FA 18:4 and 20:5 could increase by pair with the quantity of chlorophylls pigment; this is the case in our study only for France and Portugal.

Conclusion

To be able to validate the visible tendencies during this sampling, it would be necessary to redo these analyses over a longer period to study all the tendencies along the year. It would be also interesting to make a sharper analysis of sugars and proteins by obtaining the composition of amino acids by HPLC analysis (Chabeaud 2009). Our results showed that each macromolecule is extremely variable among sites and countries, and interestingly that individuals of *Sargassum muticum* from Norway and Portugal presented very similar chemical response to very different environmental conditions. We may assume that the metabolomic response of *Sargassum muticum* is quite similar at the extreme limits of its latitudinal range within Europe. Indeed, in Portugal and Norway individuals of *S.muticum* are rich in carbohydrates, proteins, fatty acids (this study) and also in phenolics (see Tanniou et al. 2014). Moreover, our results highlighted also a similar chemical response between French and Irish sites, representing respectively oldest and new introduced sites. This work also highlights the difficulty connecting tendencies between the macromolecules contents and environmental conditions, changing at different scales, day, week and season.

Acknowledgments

This study is part of the Ph.D. thesis work carried out by the first author within the Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR UMR 6539) set at the IUEM (UBO-UEB). It was supported by the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (UBO allocation for the first author). Authors would like to thank M.A. Poullaouec, I. Bihannic, students and staff of the Research Group for their help. This study is related to two research projects: BIOTECMAR (Interreg IVB, 2009-2011) and INVASIVES (Era-net, 2012-2016).

References

Alberte RS, Friedman AL, Gustafson DL, Rudnick MS, Lyman H (1981) Lightharvesting systems of brown algae and diatoms. Isolation and characterization of chlorophyll a and chlorophyll c and fucoxanthin pigment-protein complexes. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics 635:304-316.

Aguilera J, Bischof K, Karsten U, Hanelt D, Wiencke C (2002) Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. II. Pigment accumulation and biochemical defence systems against high light stress. Marine Biology 140:1087-1095.

Al-Hasan R, Ali AL, Radwan S (1990) Lipids, and their constituent fatty acids, of Phaeocystis sp. from the Arabian Gulf. Mar Biol 105:9–14.

Bäck S, Collins JC, Russell G (1992) Comparative ecophysiology of Baltic and Atlantic Fucus vesiculosus. Mar Ecol Prog Ser 84:71–82.

Bidigare R, Van Heukelem L, Trees C (2005) Algal culturing techniques in Analysis of algal pigments by High-Performance Liquid Chromatography. Andersen, R. (ed.) Elsevier Academic Press, 327-345.

Black WAP (1948) The seasonal variation in chemical composition of some of the littoral seaweeds common to Scotland. 1. Ascophyllum nodosum. J. Soc. Chem. Ind. 67: 355–7.

Bradford, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Chabeaud A , Vandanjon L, Bourseau P, Jaouen P, Chaplain-Derouiniot M, Guerard F (2009) Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: Application to the refining of bioactive peptidic fractions. Separation and purification technology 66: 463-471.

Davison IR (1987) Adaptation of photosynthesis in Laminaria saccharina (Phaeophyta) to changes in growth temperature. Journal of Phycology 23:273-283.

Davison IR (1991) Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. J. Phycol. 27:2–8.

De Martino A, Douady D, Quinet-Szely M, Rousseau B, Crépineau F, Apt K, Caron L (2000) The light-harvesting antenna of brown algae. European Journal of Biochemistry 267:5540-5549.

Demmig-Adams B, Adams WW (1992) III. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 43:599-626.

Demmig-Adams B, Adams WW (1996) III. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. Trends in Plant Science 1:21-26.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.

Eggert A. and Wiencke C (2000) Adaptation and acclimation of growth and photosynthesis of five Antarctic red algae to low temperatures.Polar Biology 23: 609-618 .

El-Naggar MEE (1994) Effect of Different Environmental Factors on the Major Chemical Constituents of Some Marine Algae. Mar. Sci. 5: 91-105.

Engelen A, Espirito-Santo C, Simoes T, Monteiro C, Serrao EA, Pearson GA, Santos ROP (2008) Periodicity of propagule expulsion and settlement in the competing native and invasive brown seaweeds, *Cystoseira humilis* and *Sargassum muticum* (Phaeophyta). European Journal of Phycology 43: 275-282.

Fleurence J (1999) Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. Trends Food Sci. Technol.10:25–8.

Fleurence J, Gutbier G, Mabeau S and Ceray C (1994) Fatty acids from 11 marine macro-algae of the French Brittany coast. J. Appl. Phycol. 6: 527-532.

Gerasimenko NI, Busarova NG, Moiseenko OP (2010) Seasonal Changes in the Content of Lipids, Fatty Acids, and Pigments in Brown Alga Costaria costata. Russian Journal of Plant Physiology 57: 205–211.

Gorham J, Lewey SA (1984) Seasonal changes in the chemical composition of *Sargassum muticum.* Mar Biol 80:103–7.

Harnedy P, FitzGerald RJ (2011) Review of bioactive protein, peptides and amino acids from macroalgae. J. Phycol. 47:218–32.

Harwood JL and Jones AL (1989) Lipid metabolism in algae. Adv.Bot. Res. 16: 1-53.

Honya M, Kinoshita T, Ishikawa M, Mori H, Nisizawa K (1994) Seasonal Variation in the Lipid Content of Cultured *Laminaria japonica*: Fatty Acids, Sterols, β_Carotene and Tocopherol, J. Appl. Phycol. 6: 25–29.

Hurtado MA, Manzano-Sarabia M, Hernández-Garibay E, Pacheco-Ruíz I, Zertuche-González JA (2011) Latitudinal variations of the yield and quality of agar from *Gelidium robustum* (Gelidiales, Rhodophyta) from the main commercial harvest beds along the western coast of the Baja California Peninsula, Mexico. J Appl Phycol 23:727-734.

Incera M, Olabarria C, Troncoso JS, Lopez J (2009) Response of the invader Sargassum muticum to variability in nutrient supply. Marine Ecological Progress Series 377: 91-101.

Jeon S, Woo M, Kim H, Do G, Shin Y, Choi M (2008) Antiobese effects of seaweed ethanol extract containing fucoxanthin in the C57BL/6J mice. Journal of Clinical Lipidology 2: S117-S118.

Jones AL and Harwood JL (1993) Lipid metabolism in the brown marine algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. J. Exp. Bot. 44: 1203-1210.

Kim MK, Dubacq JP, Thomas JC, Giraud G (1996) Seasonal Variation of Triacylglycerols and Fatty Acids in *Fucus serratus*, Phytochemistry 43: 49–55.

Koivikko R (2008) Brown algal phlorotannins: improving and applying chemical methods. Astronomica - Chemica - Physica – Mathematica, Turquie, pp.1-61.

Kraan S (2008) *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt in Ireland: an invasive species on the move. Journal of Applied Phycology 20: 825-832.

Kuebler JE, Davison IR, Yarish C (1991) Photosynthetic adaptation to temperature in red algae *Lomentaria baileyana* and *Lomentaria orcadensis*. European Journal of Phycology 26:9-19.

Kumari P, Kumar M, Gupta V, Reddy CRK, Jha B (2009) Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. Food Chem 120:749–57.

Le Lann K, Connan S, Stiger-Pouvreau V (2012) Phenology, TPC and size-fractioning phenolics variability in temperate Sargassaceae (Phaeophyceae, Fucales) from Western Brittany: Native versus introduced species. MERE 80: 1-11.

López-Figueroa F (1992) Diurnal variation in pigment content in *Porphyra laciniata* and Chondrus crispus and its relation to the diurnal changes of underwater light quality and quantity. Mar. Ecol. 13:285–305.

Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Miyashita K (2007) Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice. J. of Agricultural and Food Chemistry 55: 7701-7706.

Marinho-Soriano E, Fonseca PC, Carneiro MAA, Moreira WSC (2006) Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. Bioresour Technol 97: 2402–6.

Meiser A, Schmid-Staiger U, Trösch W (2004) Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor. J Appl Phycol 16:215–25.

Michel G, Nyval-Collen P, Barbeyron T, Czjzek M, Helbert W (2006) Bioconversion of red seaweed galactans: a focus on bacterial agarases and carragenases. Appl Microbiol Biotechnol 71:23–33.

Mouradi-Givernaud A, Givernaud T, Morvan H, Cosson J (1992) Agar from *Gelidium latifolium* (Rhodophyceae, Gelidiales): biochemical composition and seasonal variations. Bot. Mar. 35:153–60.

Napolitano GE (1994) The Relationship of Lipids with Light and Chlorophyll Measurements in Freshwater Algae and Periphyton. J. Phycol. 30: 943–950.

Olabarria C, Rodil IF, Incera M, Troncoso JS (2009) Limited impact of *Sargassum muticum* on native algal assemblages from rocky intertidal shores. Marine Environmental Research 67: 153-158.

Padilla-Gamiño JL, Carpenter RC (2007) Thermal ecophysiology of *Laurencia pacifica* and *Laurencia nidifica* (Ceramiales, Rhodophyta) from tropical and warm-temperate regions. J Phycol 43:686–92.

Plouguerné E, Hellio C, Cesconetto C, Thabard M, Mason K, Véron B, et al. (2010) Antifouling activity as a function of population variation in *Sargassum vulgare* from the littoral of Rio de Janeiro (Brazil). J Appl Phycol 22:717–24.

Plouguerné E, Le Lann K, Connan S, Jechoux G, Deslandes E, Stiger-Pouvreau V (2006) Spatial and seasonal variation in density, reproductive status, length and phenolic content of the invasive brown macroalga *Sargassum muticum* (Tendo) Fensholt along the coast of Western Brittany (France). Aquat. Bot. 85: 337-4.

Pörtner HO, Bennett AF, Bozinovic F, Clarke A, Lardies MA, Lucassen M, Pelster B, Schiemer F, Stillman JH (2006). Trade-offs in thermal adaptation: the need for a molecular to ecological integration. Physiol. Biochem. Zool. 79:295-313.

Ramus J, Beale SI, Mauzerall D (1976) Correlation of changes in pigment content with photosynthetic capacity of seaweeds as a function of water depth. Mar Biol 37:231–8.

Ramus J, Lemons F, Zimmerman C (1977) Adaptation of light-harvesting pigments to downwelling light and the consequent photosynthetic performance of the eulittoral rockweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. Mar Biol 42:293–303.

Rinaudo M (2007) Seaweed polysaccharides. In: Kamerling JP, editor. Comprehensive glycoscience from chemistry to systems biology, vol 2. London: Elsevier; p. 691–735.

Rioux L-E, Turgeon SL, Beaulieu M (2007). Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. Carbohydrate Polymers, 69(3): 530-537.

Ruban AV, Berera R, Illioaia C, van Stokkum IHM, Kennis TM, Pascal AA, van Amerongen H, Robert B, Horton P, van Grondelle R (2007) A mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. Nature 450:575–578.

Sampath-Wiley P, Neefus CD, Jahnke LS (2008) Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützing (Rhodophyta, Bangiales). J Exp Mar Biol Ecol 361:83–91.

Sanchez-Machado DI, Lopez-Cervantes J, Lopez-Hernandez J, Paseiro-Losada P (2004) Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. Food Chemistry 85: 439-444.

Sanina NM, Goncharova SN, Kostetsky EY (2008) Seasonal changes of fatty acid composition and thermotropic behavior of polar lipids from marine macrophytes, Phytochemistry 69: 1517–1527.

Staehr PA, Wernberg T (2009) Physiological responses of *Ecklonia radiata* (Laminariales) to a latitudinal gradient in ocean temperature. J Phycol 45:91–9.

Stengel D, Connan S, Popper Z (2011) Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. Biotechnology Advances 29:483–501.

Sukenik A, Carmeli Y, Berner T (1989) Regulation of Fatty Acid Composition by Irradiance Level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis sp.* J. Phycol.25: 686–692.

Takagi T, Asahi M, Itabashi Y (1985) Fatty acid composition of twelve algae from Japanese waters. Yukagaku 34: 1008–1012.

Tanniou A, Vandanjon L, Incera M, Serrano Leon E, Husa V, Le Grand J, Nicolas J-L, Poupart N, Kervarec N, Engelen A, Walsh R, Guerard F, Bourgougnon N, Stiger-Pouvreau V (2014) Assessment of the spatial variability of phenolic contents and associated bioactivities in the invasive *Sargassum muticum* sampled along its European range from Norway to Portugal. J Appl Phycol DOI: 10.1007/s10811-013-0198-x

Terasaki M, Hirose A, Narayan B, Baba Y, Kawagoe C (2009) Evaluation of recoverable functional lipid components of several brown seaweeds (Phaeophyta) from Japan with special references to fucoxanthin and fucosterol contents. J Phycol 45: 974–80.

Wright SW, Jeffrey SW, Mantoura RFC, Llewellyn CA, Bjornland T, Repeta, D, Welschmeyer N (1991) Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids in marine phytoplankton. Marine Ecology Progress Series 77:183-196.

Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T (1999) Fucoxanthin as the Major Antioxidant in Hijikia fusiformis, a Common Edible Seaweed. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 63: 605-607.

III.3.3.3. Evolution des teneurs en macromolécules par rapport aux paramètres environnementaux

Le tableau III.4 résume les effets des quatre paramètres environnementaux suivis sur les quatre compartiments macromoléculaires étudiés au paragraphe B (Tableau III.4). Ainsi, la lumière reçue, estimée par la radiation disponible pour la photosynthèse (PAR) a une influence statistiquement significative ($p<0.01$) sur tous les compartiments, c'est-à-dire les lipides, la teneur en carbohydrates, les protéines ainsi que sur la teneur en composés phénoliques (CP). En revanche, la salinité et la teneur en carbone inorganique dissous (CID) est négativement corrélée avec la teneur en carbohydrates ($p<0.05$). De même la teneur en carbone inorganique dissous joue un rôle négatif sur la teneur en protéines chez *Sargassum muticum* ($p<0.01$).

Tableau III.4. Coefficient de corrélation de Pearson (coefficient r) entre les paramètres environnementaux et la composition en macromolécules (lipides, carbohydrates, protéines et composés phénoliques) chez l'algue brune introduite Sargassum muticum. Lorsque les résultats étaient significatifs à p<0.01, ils sont présentés en gras (en rouge lorsque les corrélations étaient négatives et bleu pour les corrélations positives).

	Lipides	Carbohydrates	Protéines	CP
Carbone inorganique dissous	0.21	**-0.37** *	**-0.43**	**-0.22**
Température de surface de la mer	0.04	-0.19	0.11	**0.61**
Salinité	-0.20	**-0.33** *	0.02	**0.48**
Radiation Disponibles pour la PS (PAR)	**0.65**	**0.60**	**0.64**	**0.73**

CP, Composés phénoliques ; PAR, Rayonnement Photosynthétiquement Actif disponible. Un « * » est noté lorsque les corrélations statistiquement significatives à p<0.05 (en gras) ne l'était plus à p<0.01.

Le Tableau III.5 présente les corrélations obtenues entre la teneur en différents pigments et les paramètres environnementaux. Étonnamment, les correspondances statiquement remarquables ne sont pas celles concernant le facteur luminosité. En effet le PAR n'est lié négativement qu'avec trois pigments : Chlorophylle c2, la fucoxanthine ($p<0.05$) ainsi que le β-carotène ($p<0.01$). En revanche, les teneurs en certains pigments tels que la violaxanthine, la fucoxanthine, la Chl c2 et le β-carotène sont positivement corrélées avec les trois autres paramètres et en particulier avec la teneur en CI et la salinité de l'eau. La teneur en zéaxanthine augmente avec la diminution de la valeur de tous les paramètres ($p<0.01$), excepté la luminosité pour laquelle la corrélation visible n'est pas significative ($p>0.05$).

Tableau III.5. Coefficient de corrélation de Pearson (coefficient r) entre les paramètres environnementaux et la composition pigmentaire chez *Sargassum muticum*. Lorsque les résultats étaient significatifs à p<0.01, ils sont présentés en gras (en rouge lorsque les corrélations étaient négatives et bleu pour les corrélations positives).

	Chlorophylles		Caroténoïdes			
	Chl *c2*	Chl *a*	Fucoxanthine	Violaxanthine	Zéaxanthine	β-carotène
Carbone inorganique dissous	**0.55**	0.05	**0.49**	**0.54**	**-0.45**	**0.32** *
Température de surface de la mer	0.21	0.09	**0.39**	**0.54**	**-0.73**	0.10
Salinité	**0.33** *	-0.01	**0.57**	**0.61**	**-0.87**	**0.35** *
Radiation Disponibles pour la PS (PAR)	**-0.40**	0.18	**-0.30** *	0.00	0.20	**-0.56**

Chl, Chlorophylle, PAR, Rayonnement Photosynthétiquement Actif disponible. Un « * » est noté lorsque les corrélations statistiquement significatives à p<0.05 (en gras) ne l'était plus à p<0.01.

Si on observe le compartiment lipidique plus en détails, on remarque que les paramètres environnementaux n'ont pas la même influence sur tous les acides gras (Tableau III.6). D'où l'intérêt de regarder les variations à cette échelle également et pas seulement sur la teneur en lipides totaux. Ainsi, la teneur en acide myristique apparait négativement corrélée à la température et la salinité (p<0.01) alors que l'acide palmitique apparaît négativement corrélé à la luminosité (p<0.01). Enfin, de nombreux acides gras polyinsaturés, surtout des ω3, sont positivement corrélés à la luminosité et dans certains cas (acide α-linoleique 18 :3n-3 par exemple) à la salinité et la température (p<0.01).

Tableau III.6. Coefficient de corrélation de Pearson (coefficient r) entre les paramètres environnementaux et la composition en acides gras chez *Sargassum muticum*. Lorsque les résultats étaient significatifs à p<0.01, ils sont présentés en gras (en rouge lorsque les corrélations étaient négatives et bleu pour les corrélations positives).

	14:0	16:0	16:1n-7	18:1n-9	18:2n-6	18:3n-3	18:4n-3	20:4n-6	20:5n-3	Autres
Carbone inorganique dissous	-0.18	0.08	**0.62**	-0.10	-0.02	0.07	0.06	-0.28	-0.22	-0.03
Température de surface de la mer	**-0.47**	-0.20	0.28	0.06	**0.62**	**0.56**	0.17	0.21	-0.21	**-0.37** *
Salinité	**-0.49**	-0.02	**0.33** *	0.21	**0.60**	**0.49**	0.00	-0.03	**-0.38**	-0.23
Radiation Disponibles pour la PS (PAR)	-0.13	**-0.59**	-0.28	**-0.65**	0.14	**0.49**	**0.67**	**0.83**	**0.65**	**-0.46**

PAR, Rayonnement Photosynthétiquement Actif disponible. Un « * » est noté lorsque les corrélations statistiquement significatives à p<0.05 (en gras) ne l'était plus à p<0.01.

Afin d'analyser nos résultats en comparaison avec la littérature, nous avons présenté les résultats concernant les différents « types » d'acides gras en fonction de leur degré de saturation (Tableau III.7). Ainsi le facteur lumière est négativement corrélé à la présence d'acide gras saturé (ou absence d'insaturation) alors qu'elle est positivement corrélé à la présence d'acides gras insaturés (p<0.01). Dans une moindre mesure, on observe une influence plutôt positive de la température de l'eau sur les acides gras insaturés et plutôt négative sur les acides gras saturés (p<0.05).

Tableau III.7. Coefficient de corrélation de Pearson (coefficient r) entre les paramètres environnementaux et la composition en termes de nature des acides gras présents chez *Sargassum muticum*. Lorsque les résultats étaient significatifs à p<0.01, ils sont présentés en gras (en rouge lorsque les corrélations étaient négatives et bleu pour les corrélations positives).

	Totaux		
	SFA	UFA	PUFA
Carbone inorganique dissous	-0.03	-0.01	-0.09
Température de surface de la mer	**-0.31** *	**0.29** *	0.19
Salinité	-0.17	0.15	0.03
Radiation Disponibles pour la PS (PAR)	**-0.53**	**0.51**	**0.68**

SFA, Acide gras saturés ; UFA, Acides gras insaturés ; PUFA, Acides gras polyinsaturés, PAR, Rayonnement Photosynthétiquement Actif disponible. Un « * » est noté lorsque les corrélations statistiquement significatives à p<0.05 (en gras) ne l'était plus à p<0.01.

Les tableaux III.8, III.9 et III.10 présentent les résultats des différentes ANCOVA réalisées sur les différents compartiments.

L'analyse statistique (ANCOVA) présentée dans le Tableau III.8 permet de voir si la variabilité de la teneur en macromolécules majeures (lipides, protéines, glucides et CP) chez *Sargassum muticum* en fonction de la localité (sites, par pays) et des paramètres environnementaux est significative. On observe un effet significatif (p<0.001) du facteur 'pays' et également du facteur 'site' imbriqué dans celui-ci sur la teneur en composés phénoliques ainsi qu'un effet croisé des facteurs sites et pays sur les autres compartiments étudiés (p<0.001 sauf pour les lipides totaux où p=0.028). Mais aucun autre effet n'est observé. Aucun des paramètres environnementaux testés ne semble avoir une implication dans la variabilité de la teneur en lipides, protéines, glucides ou composés phénoliques. Ceci peut s'expliquer, comme dit plus haut par le fait que les paramètres environnementaux variaient peu d'un site à l'autre au sein d'un même pays.

Tableau III.8. Variabilité de la teneur en macromolécules majeures (lipides, protéines, glucides et CP) chez *Sargassum muticum*. Les variables sont étudiées par sites, par pays (le facteur site étant imbriqué dans le facteur pays) et en fonction des paramètres environnementaux tels que la salinité, la température de l'eau, l'intensité lumineuse ou encore la teneur en carbone inorganique. Le test *a posteriori* de Tukey a été effectué lorsque l'analyse de covariance à deux facteurs (ANCOVA) montrait des différences significatives.

Variable	Test satistique		Facteurs fixes			Co-variables			
			Pays	Site	Pays*Site	CI dissous	Température	Salinité	PAR
Lipides Totaux	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	1.152	0.688	2.660	1.931	0.506	0.070	2.089
		p	0.355	0.511	0.028	0.176	0.483	0.793	0.160
Protéines	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	1.806	2.571	4.633	0.255	0.010	0.042	0.814
		p	0.158	0.096	*p<0.001*	0.618	0.920	0.839	0.375
Carbohydrates	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	1.172	1.014	10.346	0.513	0.061	0.007	0.243
		p	0.346	0.377	*p<0.001*	0.480	0.807	0.934	0.626
Composés Phénoliques	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	13.304	58.581	42.536	0.352	4.105	0.007	2.293
		p	*p<0.001*	*p<0.001*	*p<0.001*	0.558	0.053	0.934	0.142

L'analyse statistique (ANCOVA) présentée dans le Tableau III.9 permet de voir si la variabilité de la composition pigmentaire chez *Sargassum muticum,* est significative, en fonction de la localité (sites, par pays) et des paramètres environnementaux. On observe un effet significatif ($p<0.001$) du facteur 'pays' pour tous les pigments sauf pour la Chlc et la zéaxanthine ($p=0.206$ et $p=0.251$ pour la Chlc et la zéaxanthine, respectivement). L'effet du facteur 'site' imbriqué dans le facteur 'pays' est également visible pour tous les pigments, exceptée la fucoxanthine ($p=0.125$). Enfin, on observe un effet significatif du facteur 'pays*site' sur la composition pigmentaire. Aucun des paramètres environnementaux testés ne semble avoir une implication dans la variabilité de la teneur en acides gras à différents degrés de saturation. La même explication que pour les autres compartiments peut être avancée : les paramètres environnementaux varient peu ou pas d'un site à l'autre au sein d'un même pays.

Tableau III.9. Variabilité de la composition pigmentaire chez *Sargassum muticum*. Les variables sont étudiées par sites, par pays (le facteur site étant imbriqué dans le facteur pays) et en fonction des paramètres environnementaux tels que la salinité, la température de l'eau, l'intensité lumineuse ou encore la teneur en carbone inorganique. Le test *a posteriori* de Tukey a été effectué lorsque l'analyse de covariance à deux facteurs (ANCOVA) montrait des différences significatives.

Variable	Test satistique		Facteurs fixes			Co-variables			
			Pays	Site	Pays*Site	Cl dissous	Température	Salinité	PAR
Chlorophylle *c2*	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	1.584	35.454	157.321	0.019	1.901	0.033	4.046
		p	0.208	*p<0.001*	*p<0.001*	0.891	0.180	0.858	0.055
Chlorophylle *a*	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	4.120	163.122	287.163	0.117	1.288	0.003	0.288
		p	0.010	*p<0.001*	*p<0.001*	0.735	0.267	0.957	0.596
Fucoxanthine	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	6.347	2.257	65.505	0.028	0.409	0.768	0.874
		p	0.001	0.125	*p<0.001*	0.869	0.528	0.389	0.358
Violaxanthine	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	21.124	28.039	264.229	0.071	0.340	1.384	6.081
		p	*p<0.001*	*p<0.001*	*p<0.001*	0.792	0.565	0.250	0.021
Zéaxanthine	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	1.434	50.348	25.357	0.011	0.073	0.673	1.260
		p	0.251	*p<0.001*	*p<0.001*	0.918	0.790	0.420	0.272
β-carotène	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	10.407	9.900	101.802	0.640	0.280	2.793	0.002
		p	*p<0.001*	0.001	*p<0.001*	0.431	0.601	0.107	0.968

L'analyse statistique (ANCOVA) présentée dans le Tableau III.10 permet de voir si la variabilité de la teneur en différents « types » (en fonction de leur degré de saturation) d'acides gras chez *Sargassum muticum,* est significative, en fonction de la localité (sites, par pays) et des paramètres environnementaux. On observe un effet significatif ($p<0.001$) du facteur 'site' imbriqué dans le facteur 'pays' dans celui-ci pour les UFA et les PUFA. La variabilité en SFA ne semblant dépendre que du croisement des facteurs 'site' et 'pays'. Aucun des paramètres environnementaux testés ne semble avoir une implication dans la variabilité de la teneur en acides gras à différents degré de saturation. La même explication que pour les autres compartiments peut être avancée : les paramètres environnementaux varient peu ou pas d'un site à l'autre au sein d'un même pays.

Tableau III.10. Variabilité de la teneur en lipides et acides gras chez *Sargassum muticum*. Les variables sont étudiées par sites, par pays (le facteur site étant imbriqué dans le facteur pays) et en fonction des paramètres environnementaux tels que la salinité, la température de l'eau, l'intensité lumineuse ou encore la teneur en carbone inorganique. Le test *a posteriori* de Tukey a été effectué lorsque l'analyse de covariance à deux facteurs (ANCOVA) montrait des différences significatives.

Variable	Test satistique		Facteurs fixes			Co-variables			
			Pays	Site	Pays*Site	CI dissous	Température	Salinité	PAR
Lipides Totaux	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	1.152	0.688	2.660	1.931	0.506	0.070	2.089
		p	0.355	0.511	0.028	0.176	0.483	0.793	0.160
SFA	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	0.267	3.063	6.307	0.001	0.363	0.360	0.241
		p	0.896	0.064	*p<0.001*	0.971	0.552	0.554	0.628
UFA	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	0.285	3.721	5.918	0.001	0.660	0.093	0.245
		p	0.885	0.038	*p<0.001*	0.982	0.424	0.763	0.624
PUFA	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	0.496	3.908	12.557	0.289	0.055	0.003	0.861
		p	0.739	0.033	*p<0.001*	0.596	0.816	0.956	0.362

III.3.4.Discussion

III.3.4.1. Taille des individus de *Sargassum muticum* en fonction des paramètres du milieu

Nous avons mis en évidence des différences de taille des individus de *Sargassum muticum* le long d'un gradient européen. Nos résultats ont montré, sur la taille des individus:

- un effet négatif de la température, de la salinité et de la teneur en carbone inorganique dissous

- un effet positif de la luminosité

Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus par d'autres auteurs sur la même espèce, étudiée à l'échelle d'un pays. En effet, Plouguerné *et al.* (2006) ont montré que le type de substrat et la salinité influaient sur la longueur des thalles de *S. muticum*. Cependant, pour ces auteurs, c'est une salinité trop faible qui aurait tendance à pénaliser la croissance des thalles et non une salinité trop élevée. Pourtant, si on considère l'origine de cette espèce, c'est-à-dire les côtes du Japon (*cf.* Chapitre I), il faut noter que la salinité y est particulièrement faible comparée à celles qu'on peut retrouver en Europe. Si on part du principe qu'un stress salin peut jouer négativement sur la croissance, il est alors logique que dans notre étude la croissance soit moins importante en réponse aux fortes salinités que l'on peut retrouver au sud du gradient, en particulier. Il faut souligner que la différence d'échelle entre notre étude et celle de Plouguerné *et al.* (2006) peut expliquer à elle seule les deux tendances opposées trouvées. En effet, dans notre étude la salinité varie de 34 à 37 psu alors que les variations observées par ces auteurs s'échelonnaient de 30 à 35 psu. La « faible salinité » citée était donc de l'ordre de 30 psu. Il est donc tout à fait envisageable que les très fortes salinités observées dans notre étude soient néfastes à la croissance de l'algue. Il est aussi intéressant de souligner, que, même si les algues ont été échantillonnées dans un même état physiologique, leur stade

de croissance n'était pas forcément exactement identique d'un pays à l'autre au moment de l'échantillonnage.

Plouguerné *et al.* (2006) avaient également montré que la température de l'eau influençait la croissance de certaines espèces de Sargassacées. Hwang *et al.* (2004) arrivent aux mêmes conclusions chez des populations de Sargasses du sud de Taiwan. En France, l'influence de la température pouvait être positive ou négative suivant la sensibilité de l'espèce à l'augmentation de la température de l'eau. Dans le cadre de notre étude, il semble que *S.muticum* soit sensible, au moins au niveau de sa croissance aux fortes températures, sachant que les paramètres physiques (température, pH, concentration en oxygène et dioxyde de carbone et ses dérivés, dissous, salinité) évoluent de façon drastique au sein des mares lors d une marée et ce, particulièrement en été ou en période de forte chaleur ce qui a été le cas lors de l'échantillonnage ; le printemps 2011 ayant été particulièrement ensoleillé et chaud.

III.3.4.2. Effet des paramètres environnementaux sur les compartiments macromoléculaires

Les résultats présentés dans le manuscrit Tanniou *et al.* (soumis) (*cf.* paragraphe III.3.3.2), ainsi que l'analyse de corrélations réalisée nous permettent d'en déduire les tendances suivantes (Tableau III.11).

Tableau III.11. Récapitulatif des données obtenues lors de cette étude (PE) par rapport aux conclusions obtenues dans la littérature (L)

		Facteurs étudiés							
		Salinité		Lumière		Température		Nutriments	
		L	PE	L	PE	L	PE	L	PE
Compartiment	**Composés phénoliques**	-	+	+	+	-	+	-	(-)
	Lipides	-	(-)	*n.r.*	+	-	(0)	+	(+)
	SFA	*n.r.*	(-)	*n.r.*	-	+	-	*n.r.*	(0)
	PUFA	*n.r.*	(0)	-	+	-	(+)	*n.r.*	(-)
	UFA	*n.r.*	(+)	*n.r.*	+	*n.r.*	+	*n.r.*	(0)
	Protéines	-	(0)	-	+	-	(+)	+	-
	Carbohydrates	+	-	+/-	+	+	(-)	-	-
	Pigments	*n.r.*	*n.r.*	+/-	*n.r.*	*n.r.*	*n.r.*	+	*n.r.*
	Zéaxanthine	*n.r.*	-	+	(+)	*n.r.*	-	*n.r.*	-
	Violaxanthine	*n.r.*	+	-	(0)	*n.r.*	+	*n.r.*	+
	Fucoxanthine	*n.r.*	+	*n.r.*	-	*n.r.*	+	*n.r.*	+
	β-carotène	*n.r.*	+	*n.r.*	-	*n.r.*	(+)	*n.r.*	+
	Chl c2	*n.r.*	+	*n.r.*	-	*n.r.*	(+)	*n.r.*	+
	Chl a	*n.r.*	(0)	*n.r.*	(+)	*n.r.*	(+)	*n.r.*	(0)

***n.r.*, non renseigné ; - ou +, corrélation négative ou positive significative ($p<0.05$) ; (0), pas de corrélation ; (-) ou (+), corrélation positive ou négative non significative ; L, données issues de la littérature (Chapitre I.) ; PE, données issues de la « présente étude ».**

Les valeurs de corrélations obtenues, nous permettent d'avoir une idée des sources de variations possibles par compartiment étudié. Pour plus de clarté la discussion sera organisée par compartiment étudié.

a) Effet sur la teneur en carbohydrates totaux

La **quantité de carbohydrates varie négativement avec la teneur en carbone inorganique dissous** et la **salinité**. En revanche, elle est positivement corrélée à l'intensité lumineuse reçue. Il a été montré dans de nombreuses études que les deux sources majeures de variation pour la teneur en carbohydrates sont les saisons et/ou le stade de croissance de l'algue (Stengel *et al*., 2011). La quantité de glucides peut également augmenter en réponse à un stress salin, ce qui n'est pas le cas dans notre étude, puisque la salinité et la teneur en glucides ne varient pas de la même manière. Il est important de souligner qu'ici encore, la quantité en carbohydrates est soumise à des variations annuelles importantes ; leur augmentation est souvent **corrélée à une baisse de la température de l'eau de mer et/ou de la luminosité** ce qui explique qu'elle se produise surtout durant la période hivernale. Cette idée est confirmée par les travaux de Mouradi-Givernaud *et al*. (1992) et de El-Naggar (1994). Ce phénomène s'explique en partie par le besoin des macroalgues de mobiliser des ressources carbonées durant cette période. Dans notre étude, cette hypothèse peut s'avérer exacte dans le cas des individus de *S. muticum* installés en Norvège, où la température est la plus basse et où l'on retrouve la plus grande teneur en glucides (>12%PS). Cela reste également cohérent pour les pays du centre du gradient : Irlande, France et Espagne où la température moyenne varie entre 12 et 14°C. Cependant le cas du Portugal est très étonnant puisque la teneur en glucides observée est assez importante (>8%PS) alors que ni la luminosité ni la température de l'eau n'étaient faibles au moment de l'échantillonnage. Par ailleurs, une grande variabilité inter-site a été mise en évidence lors du dosage des glucides. La valeur obtenue pour le site 1 du Portugal étant cohérente avec la **théorie de la corrélation de la teneur en glucides avec la température de l'eau. Il serait intéressant de mener une étude en milieu contrôlé afin de tester l'hypothèse avancée.**

b) Effet sur la teneur en protéines totales

Les algues brunes contiennent généralement moins de protéines que les autres classes de macroalgues. Les teneurs varient entre 3 et 15% (Harnedy et FiztGerald, 2011). Nos travaux montrent que les algues récoltées contiennent moins de 1.5% PS de protéines quel que soit le pays échantillonné. Les variations des paramètres tels que la salinité, l'intensité lumineuse, la température de l'eau sont souvent corrélées négativement à la teneur en protéines comme le soulignent Stengel *et al.* (2011). Seule la teneur en nutriments, et en particulier la concentration en azote dissous, est corrélée positivement à la teneur en protéines (Stengel *et al.*, 2011). Notre étude a permis de montrer que, malgré les différences géographiques, la teneur en protéines ne varie pas énormément d'un site ou d'un pays à l'autre. Pourtant de nombreuses études ont montré que les sources de variations étaient nombreuses : saisons, quantité de nutriments disponible et salinité en particulier (Stengel *et al.*, 2011). En effet, si nous regardons les variations inter-sites, au sein d'un même pays, nous remarquons que **les algues provenant des sites situés près d'une zone à activité anthropique élevée** tel que le site 1 de l'Espagne proche d'un port, **contiennent davantage de protéines** que celles des deux autres sites. Certains auteurs ont montré qu'au sein du genre *Sargassum*, les espèces possèdent davantage de protéines en hiver et au début du printemps ce qui serait corrélé à la quantité plus importante d'azote dans l'eau de mer (Gorham et Lewey,

1984 ; El-Naggar, 1994). Si on part du principe que cette quantité d'azote et plus ou moins due à une faible température de l'eau alors cela pourrait expliquer les fortes teneurs en protéines retrouvées chez les individus de *S. muticum* provenant de Norvège. Un rôle négatif de la salinité sur la production de protéines par les algues a été avancé par Marinho-Soriano *et al.* (2006) sur la même espèce. Dans notre étude, le rôle de la salinité lors des calculs de corrélation n'est pas mis en avant et ne semble pas avoir d'effet significatif. Cependant on peut quand même constater, pour la Norvège par exemple, là où la salinité est la plus faible (34 psu) une forte teneur en protéines. En revanche, cela n'explique pas la forte teneur retrouvée dans les algues provenant du Portugal, où la salinité est la plus élevée (37 psu en moyenne) : la cause est donc différente. **Notre étude a mis en avant un lien fort entre l'intensité lumineuse reçue par les algues et la teneur en protéines.** De nombreux auteurs ont par ailleurs mis en avant **l'effet négatif de la température de l'eau sur la croissance des thalles** et donc **sur la production des algues en général** (Davison, 1991; Pörtner *et al.*, 2006 ; Padilla-Gamino et Carpenter, 2007 ; Staehr et Wernberg, 2009). Dans cette étude, comme plus haut, nous constatons une grande variabilité dans la longueur des thalles suivant les pays. Ainsi, les individus de *S. muticum* provenant d'Espagne possèdent les plus petites tailles et également la plus petite teneur en protéines et en glucides totaux par exemple. Afin de vérifier cette hypothèse, une rapide analyse de corrélation de Pearson a été effectuée et **une corrélation positive ($p<0.01$) existe entre la longueur des thalles et la teneur en protéines ($r= 0.44$; $p < 0.01$) et en glucides ($r=0.65$; $p < 0.01$) totaux.**

Comme pour les autres molécules étudiées, des variations entraînant des changements dans la composition en protéines peuvent intervenir à de très petites échelles de temps, de l'ordre de la journée par exemple (López-Figueroa, 1992; Sampath-Wiley *et al*., 2008). Ce point biaise les résultats obtenus pour toute étude sur un prélèvement journalier unique.

c) Effet sur la composition en pigments

Le contenu pigmentaire dépend des conditions d'éclairement. Certaines études ont montré que la quantité de pigments totaux était plus importante dans les thalles exposés à de faibles intensités lumineuses (Ramus *et al.*, 1976, 1977 ; Aguilera *et al*., 2002). Cette stratégie vise à augmenter ainsi leur capacité d'absorption de la lumière. En cas de fortes illuminations, certains pigments permettent de protéger l'algue de la photo-oxydation, grâce notamment au cycle des xanthophylles, bien connu chez les algues brunes (Demmig-Adams et Adams, 1992, Ruban *et al.,* 2007). Demmig Adams *et al.* (1996) ont par ailleurs montré que chez les plantes supérieures, le ratio chlorophylles/caroténoïdes diminuait en cas de surexposition à la lumière. Dans notre étude cela ne semble pas être le cas. En effet, dans les deux pays pour lesquels ce rapport est le plus faible (Espagne et Portugal), on pourrait s'attendre à avoir des intensités lumineuses importantes. Or, lors de l'échantillonnage, les intensités lumineuses étaient moindres pour l'Espagne. De même, dans notre étude, le ratio zéaxanthine/violaxanthine est le plus important dans les échantillons provenant du nord du gradient et plus faible dans les pays du sud (France, Espagne et Portugal) où la luminosité est habituellement la plus importante. Si, pour les échantillons provenant d'Espagne, il était logique de trouver plus de violaxanthine étant donné le faible éclairement à la période d'échantillonnage ; pour les autres pays, du nord du gradient, l'intensité lumineuse ne peut pas expliquer les tendances

observées, à savoir la présence de zéaxanthine en grande quantité. Il est cependant possible que les algues aient eu à se protéger d'intensités lumineuses plus importantes qu'à l'accoutumée. Pour les algues provenant de Norvège cela peut s'expliquer par le fait que la période d'échantillonnage correspondait à une période de changement rapide de la luminosité, en l'occurrence la fin de la période de nuit perpétuelle. Il faut ajouter que le printemps 2011 a été particulièrement ensoleillé en Europe. Au contraire les grandes quantités de violaxanthine retrouvées dans les autres pays seraient en ce cas, de façon indirecte, des réserves de zéaxanthine potentielles en cas de fortes intensités lumineuses dans des pays où ce n'est généralement pas courant.

d) Effet sur la composition en acides gras

Nous avons vu que la quantité de lipides variait positivement avec la luminosité. Parmi les différents type d'acides gras dosés, nous avons vu que :

- les quantités d'acides gras saturés varient négativement avec la lumière et la température

- les quantités d'acides gras polyinsaturés varient positivement avec la lumière

- et qu'enfin, les quantités d'acides gras insaturés (mono- ou poly-) varient positivement avec la lumière et la température

En général, les algues ne contiennent que très peu de lipides (El-Naggar, 1994; Fleurence *et al*., 1994; Kurami *et al*., 2009). Ici le contenu lipidique total varie de 1.00 à 1.62 % PS suivant les pays. Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues pour d'autres macroalgues. En effet, les travaux de Mabeau et Fleurence (1993) montrent que dans d'autres études où les contenus lipidiques pour les algues brunes sont de l'ordre de 1 à 3%PS. Bien que ces valeurs soient un peu faibles, elles sont supérieures à celle obtenues par d'autres auteurs (Indergaard et Minsaas, 1991). La composition en acides gras varie donc en fonction de la position géographique des algues. Dans notre étude, la concentration en acide oléique est corrélée négativement avec l'intensité lumineuse, suggérant donc un résultat inverse par rapport aux études précédemment réalisées sur le sujet. Ces résultats démontraient une augmentation de la quantité d'acide oléique généralement en été (Gerasimenko *et al.*, 2010) avec l'augmentation de lumière et/ou de la température (Kumari *et al*., 2009). Dans notre étude, l'acide oléique est le plus concentré pour les individus de *Sargassum muticum* installés en Irlande et en Espagne alors que les radiations et la température de l'eau ne sont pas très élevées au moment de l'échantillonnage dans ces deux pays. Cependant, si on tient compte des conditions « habituelles » de vie de cette espèce dans les pays en question, la forte teneur en acide oléique pourrait s'expliquer par un printemps particulièrement ensoleillé et chaud en 2011. Même si, les valeurs enregistrées par les satellites, de la température de l'eau (12-14°C) ainsi que de la luminosité (32.5 and 22.5 Einstein.m^{-2}.$jour^{-1}$, respectivement) n'étaient pas très élevées au moment de l'échantillonnage. Les changements de composition en acides gras dépendent de la saison (Honya *et al*., 1994 ; Kim *et al*., 1996 ; Sanina *et al.*, 2008). Certaines études ont montré qu'au printemps et en été, la quantité d'acides gras saturés (AGS) était inférieure à celle d'acides gras polyinsaturés (AGPI) même si le rapport AGS/AGPI diminue grandement en fin de période estivale (Gerasimenko *et al.*, 2010**).** Ces mêmes auteurs ont

montré que durant le printemps et l'été la quantité d'acides gras saturés (AGS) est inférieure à la quantité totale d'acide gras insaturé (AGI). **Cela se vérifie dans notre étude également quel que soit le pays. Mais il faut noter que la quantité d'AGS est supérieure à celle des AGPI. C'est la grande quantité d'acides gras monoinsaturés retrouvée chez S. *muticum* qui fait, dans notre cas, évoluer la tendance.** Enfin, certains auteurs ont montré que les algues étaient capables d'accumuler des acides gras polyinsaturés en réponse à des conditions de faible luminosité (Napolitano, 1994; Sukenik *et al.*, 1989). De plus, Gerasimenko *et al.* (2010) ont montré que les quantités d'acides gras 18:4 et 20:5 avaient tendance à diminuer avec un faible éclairement. Or ici, les tendances sont complètement inversées : la **quantité d'acides gras polyinsaturés est corrélée positivement avec la quantité de radiation lumineuse reçue** par les algues, de même les acides gras 18:4 et 20:5 se retrouvent en faible quantité dans les pays recevant les intensités lumineuses les plus fortes et leur concentration semble aussi corrélée positivement à l'intensité lumineuse. Au vu de nos résultats, la seule tendance visible est une **augmentation de la quantité de lipides avec la luminosité** et un effet négatif visible mais non significatif de la salinité. De la même manière on observe un effet positif non significatif de la teneur en carbone inorganique sur la teneur en lipides totaux.

III.3.4.3. Comparaison des résultats obtenus avec les tendances visibles en IR/RMN HR-MAS

Le tableau III.12 présente les corrélations entre les tendances observées lors des analyses en RMN HR-MAS et en IR et celles observées lors des dosages chimiques des macromolécules telles que : les protéines, les lipides, les glucides, les pigments ainsi que les composés phénoliques. Les tendances observées pour chacun des compartiments sont identiques d'une technique à l'autre. Cependant, pour le compartiment pigmentaire nous ne pouvons pas comparer les résultats obtenus puisque les techniques analytiques utilisées (RMN HR-MAS et IR) ne permettent pas d'avoir vraiment une idée du contenu total en pigments, les signaux correspondant aux différents pigments n'étant pas regroupés sur les spectres.

Dans le cas du contenu protéique, nous avons vu, que cela soit par les techniques analytiques ou par les dosages chimiques, qu'il variait peu suivant les pays. On constate cependant que les algues provenant des Pays situés aux extrémités du gradient étudié, c'est-à-dire la Norvège et le Portugal, sont les plus riches en protéines.

Pour le volet lipidique, les techniques analytiques donnaient deux informations complémentaires, la RMN HR-MAS nous apprenait que la quantité d'acides gras plutôt saturés (entre 0.8 et 3.0 ppm) était plus importante dans les algues provenant d'Irlande, France et Espagne. Certains acides gras saturés sont visibles, en RMN HR-MAS, aux alentours de 4.8 ppm pour les algues provenant de France et d'Espagne. La spectroscopie Infra-rouge quant à elle permettait de comparer les teneurs totales en lipides ; ainsi les lipides étaient présents en plus grande quantité dans les algues de Norvège, France et Portugal. Les acides gras présents chez les algues provenant d'Espagne étant majoritairement saturés (*cf.* Tableau 2 dans le manuscrit présenté au paragraphe III.3.3.2) cela explique pourquoi cette algue était riche du point de vue de l'analyse en RMN HR-MAS et semble peu riche en lipides totaux (résultats

obtenus par IR). Les résultats des dosages chimiques sont en accord avec ceux obtenus par les techniques RMN HR-MAS/IR, les algues provenant de Norvège, France et Portugal sont bien plus riches en lipides totaux et les algues provenant d'Espagne sont particulièrement riches en acides gras saturés.

Dans le cas des carbohydrates, la quantité de glucides totale est plus importante dans les algues provenant de Norvège, France et Portugal au regard de la spectroscopie Infra-rouge (signaux entre 3.0 et 5.5 ppm) ainsi que d'après les dosages chimiques. La notion de variabilité inter-sites a également été mise en évidence pour ce compartiment. Ce constat est également validé par les deux types de techniques utilisées (RMN HR-MAS/IR ou dosage chimique), les écarts types pour les trois pays où l'algue est la plus riche en glucides sont en effet très important ce qui atteste de la grande variabilité de ce compartiment au sein d'un même pays.

Enfin, pour les composés phénoliques, les spectres obtenus par RMN HR-MAS, présentés au paragraphe III.2 dans le manuscrit soumis au journal Talanta, permettent de visualiser les composés aromatiques dans les algues provenant de Norvège, France et Portugal uniquement. Ce qui signifie que ces composés sont présents en très faible quantité dans les algues provenant des deux autres pays. Cela est vérifié par les dosages chimiques de Folin-Ciocalteu (*cf.* chapitre IV).

Tableau III.12. Corrélations entre les tendances observées lors des analyses en RMN HR-MAS et en IR et celles observées lors des dosages chimiques des macromolécules (protéines, lipides, glucides, pigments et composés phénoliques).

		Techniques analytiques HRMAS/IR				
		Protéines	Lipides	Sucres	Pigments	CP
Dosages chimiques	Protéines	X				
	Lipides		X			
	Sucres			X		
	Pigments				*n.s.*	
	CP					X

n.s.; non spécifié (lorsque les macromolécules n'étaient pas quantifiables avec l'une des techniques employées), « x » ; corrélation entre les deux types de techniques employées (lorsque les tendances observées sont comparables d'une technique à l'autre), CP ; Composés Phénoliques.

Ainsi, nous avons pu constater que ces deux techniques se complètent. Les techniques analytiques telles que la RMN HR-MAS et la spectroscopie IR permettant d'une part d'avoir une vue d'ensemble des compartiments étudiés et des proportions de chaque macromolécule les unes par rapport aux autres. Les dosages chimiques permettant quant à eux de doser plus précisément et donc de réellement quantifier les teneurs en macromolécules dans les thalles échantillonnés. Ainsi les premières techniques pourront être utilisées afin de cibler les compartiments soumis à variation ou encore de suivre rapidement l'évolution de tel ou tel compartiment lors d'études temporelles par exemple, alors que la deuxième permet de connaître la quantité exacte de composé dans les thalles.

III.3.5.Conclusion

Ce chapitre III permet d'avoir une vue d'ensemble des compartiments susceptibles de subir des variations selon la position géographique d'une même espèce à large répartition. Ce travail n'est qu'une première approche, il faut, afin de valider les tendances observées, étudier ces mêmes compartiments à différentes échelles : journalière, mensuelle et annuelle. Il est tout de même intéressant de voir comment une espèce est capable de changer sa composition biochimique en fonction de son environnement et ce, afin de s'acclimater à des milieux assez différents.

Nous avons souligné différents effets des paramètres environnementaux sur les compartiments lipidique, protéique, carbohydrates et pigments, ainsi que sur la taille des individus de *Sargassum muticum*. Ainsi les points principaux qui ressortent de cette étude sont les suivantes :

Taille des individus :

-Effet négatif de la température, de la salinité et de la teneur en carbone inorganique dissous

-Effet positif de la luminosité

-Une corrélation positive entre la longueur des thalles et la teneur en protéines.

Compartiment polysaccharidique :

- Il existe une corrélation positive de la teneur en glucides totaux avec la température de l'eau ;

- La quantité de polysaccharides varie négativement avec la teneur en carbone inorganique dissous et la salinité ;

- La quantité de polysaccharides est positivement corrélée à l'intensité lumineuse reçue par les algues.

Compartiment protéique :

-Les algues provenant de zones à activités anthropiques élevées contiennent davantage de protéines ;

- Il existe une corrélation négative entre la teneur en carbone inorganique dissous et la teneur en protéines ;

- Un lien fort existe entre l'intensité lumineuse reçue par les algues et la teneur en protéines.

Teneur en pigments :

- Pas de variation sensible de la quantité totale de pigments

- Nécessité de se protéger des fortes intensités lumineuses pour les algues provenant du nord du gradient

Compartiment lipidique :

- La teneur en lipides varie positivement avec la luminosité ;
- La quantité d'acide gras insaturé (AGI) est supérieure à celle des AGS ;
- Une grande quantité d'acide gras monoinsaturé est retrouvée chez cette espèce ;
- Les quantités d'acides gras saturés varient négativement avec la lumière et la température ;
- Les quantités d'acides gras polyinsaturés varient positivement avec la lumière.

En perspectives, il serait également intéressant, d'avoir une idée du type d'acides aminés présents chez cette espèce ainsi que de la quantité des différents glucides. Des aminogrammes et des analyses en HPLC pourraient être utilisés afin de compléter notre étude.

L'étude de la variabilité des composés phénoliques en fonction de la position géographique de *Sargassum muticum* a fait l'objet d'une étude plus poussée, la thèse portant avant tout sur ces molécules à haute valeur ajoutée et possédant de nombreuses activités (cf Chapitre 1). Ainsi sera présentée dans le chapitre IV suivant, une étude de la concentration de CP en fonction de la position géographique de l'espèce échantillonnée. On s'intéressera également aux activités anti-ROS et anti-bactériennes d'extraits bruts ou semi-purifiés de ces algues. Et enfin, nous essayerons, pour les pays abritant les algues les plus riches en composés phénoliques actifs, de déterminer par des techniques d'HPLC, de RMN et de spectroscopie de masse le type des composés phénoliques présents.

CHAPITRE IV

Variabilité et semi-purification des composés phénoliques de *Sargassum muticum* en Europe

IV.1. Introduction

Dans le chapitre précédent nous avons décrit les principaux compartiments biochimiques soumis à variations chez *Sargassum muticum* en Europe. Ce chapitre décrit l'effet de différents paramètres sur un compartiment en particulier : celui des composés phénoliques. Notre approche des phlorotannins se décompose en trois parties.

Dans une première partie nous avons cherché à étudier les variabilités saisonnières, spatiales (intersites), et enfin intra-individuelles par l'étude de l'effet de l'âge des thalles sur la composition en polyphénol en France. Dans ce paragraphe sont présentés les résultats de l'évolution des teneurs en composés phénoliques et de leurs activités antioxydantes et antiradicalaires associées chez *Sargassum muticum*. Ainsi le projet INVADIV (cf. Introduction) a démarré dans le but d'étudier l'impact de *Sargassum muticum,* déjà bien établie en Bretagne, sur la biodiversité et le fonctionnement de l'écosystème natif intertidal rocheux. Un volet du projet a consisté à étudier l'écologie chimique de *S. muticum*. Et en particulier au travers de l'étude des composés phénoliques qu'elle produit. Beaucoup d'études ont été menées sur *S. muticum* le long du littoral breton, mais négligeant le potentiel effet de l'âge des individus sur la défense chimique mais également sur la structuration des populations de *S. muticum*. Les objectifs de notre travail ont été d'étudier la variabilité de la défense chimique (teneur en composés phénoliques et activités associées à ces composés) en fonction de l'âge des individus, du stade de développement et de la partie du thalle (crampons et latérales) de *S. muticum* en Bretagne.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux sources de variabilité environnementale influant sur la quantité et la qualité des composés phénoliques contenus dans la Sargasse sur la façade atlantique le long des côtes européennes. Cette première étude a donc été effectuée sur des extraits bruts. Les extraits obtenus ayant montré des activités antiradicalaires et anti-microbiennes importantes nous avons tenté de trouver un protocole de semi-purification des composés phénoliques afin de les concentrer. Pour cela deux procédés de purifications ont été testés : l'un utilisant des colonnes SPE et l'autre basé sur une séparation liquide-liquide. Les fractions semi-purifiées ont permis d'effectuer des analyses en RMN à deux dimensions pour tenter de déterminer le type de composés phénolique chez la Sargasse en Europe. Pour pouvoir être utilisés en industrie, il est nécessaire de concentrer davantage les extraits obtenus mais l'utilisation de températures élevées peut dégrader certains composés, comme les phlorotannins par exemple, connus pour être thermo et photosensibles (*cf.* Chapitre I). Les procédés utilisant des membranes sont donc particulièrement intéressants car ils permettent la concentration d'un échantillon à basse température (Mello *et al*., 2010). Le choix des membranes se fait en fonction de la séparation à réaliser : d'une façon générale la taille des pores est généralement deux fois plus petite que la molécule la plus petite à retenir pour assurer une bonne rétention et surtout limiter le colmatage en profondeur de la membrane (Bessiere, 2005). Par ailleurs, si la taille des pores est deux fois plus grande que les molécules : il y a encore environ 70% de rétention des molécules sur la membrane. Le modèle de Ferry (1936) démontre que des molécules ne peuvent traverser librement la membrane (rétention < 10%) que si le diamètre du pore est 10

fois plus grand que le diamètre équivalent de la molécule. Compte tenu des précédentes études montrant une majorité de petits composés chez *S. muticum* nous avons choisi des seuils inférieurs à 30KDa. De plus, deux à trois seuils de coupures ont été testés suivant les protocoles dans le but de cibler la classe de taille des composés les plus actifs. Dans le temps imparti, l'ensemble des extraits et fractions générées par le protocole de purification n'a pu être fractionné. Ainsi, les extraits utilisés ont été les extraits bruts et purifiés du site 1 des pays Norvège et Portugal (*cf.* Chapitre I).

Dans une troisième et dernière partie, d'après les informations acquises lors du suivi des populations en milieu naturel, nous avons entrepris de tester différents paramètres en milieu contrôlé au laboratoire sur de la Sargasse récoltée en Bretagne. Les paramètres environnementaux tels que la température et la lumière entrainant des variations dans la production de phlorotannins chez *Sargassum muticum*, nous avons souhaité tester ces deux paramètres en cultures contrôlées afin de valider les constats effectués en milieu naturel et de connaitre la part exacte de chacun de ces paramètres dans les variations observées.

IV.2. Variabilité des teneurs en composés phénoliques en France

IV.2.1. Introduction

Dans ce paragraphe nous avons étudié les variabilités saisonnières, spatiales (intersites), et enfin intra-individuelles par l'étude de l'effet de l'âge des thalles sur la composition en polyphénols en France chez la macroalgue brune *Sargassum muticum* bretonne. Une partie de cette étude a été effectuée dans le cadre du stage de Master 2 de Zea (2012).

Ce volet devait nous permettre de répondre à la question suivante :

En France, comment varie la teneur en composés phénoliques chez *Sargassum muticum* en fonction de variables spatiales, temporelles et individuelles telles que : le site d'étude, la saison ou encore la partie ou l'âge du thalle considérés ?

IV.2.2. Matériels et méthodes

IV.2.2.1. Echantillonnage

a) Etude de la variabilité saisonnière

Afin d'étudier la variation de la composition en composés phénoliques chez *Sargassum muticum* en fonction des saisons et dans les mêmes conditions environnementales, nous avons travaillé sur un seul site d'échantillonnage. Les échantillonnages ont été réalisés durant les trois ans de thèse de fin Septembre 2010 à Juillet 2013 sur le site du Dellec (*cf.* Chapitre I). Un échantillonnage saisonnier a été réalisé. Ainsi les algues ont été récoltées en automne (mi-Septembre), hivers (mi-Janvier), printemps (mi-Avril, mi-Juin) et en été (mi-Juillet). Lors de la collecte des algues, les crampons ont été laissés en place. Les thalles ont

été rincés à l'eau douce avant d'être lyophilisés et broyés. La poudre obtenue a été utilisée pour les différents tests.

NB : La même étude a été menée sur *Ascophyllum nodosum*, les résultats de cette étude sont présentés en annexe n°3.

b) Etude de la variabilité spatiale de la teneur en composés phénolique chez *S.muticum* sur la pointe bretonne suivant le site d'étude

La variabilité de la composition en composés phénoliques a été étudiée sur *Sargassum muticum* en trois sites de la pointe bretonne au cours de l'année 2010-11 de Septembre à Juillet : Le Minou, Le Dellec et la pointe du diable (*cf.* Chapitre I). Un échantillonnage par saison a été réalisé ainsi les algues ont été récoltées en automne (mi-Septembre), hiver (mi-Janvier), printemps (mi-Avril, mi-Juin) et en été (mi-Juillet). Les algues ont été récoltées, le crampon a été laissé en place et les thalles ont été rincés à l'eau douce avant d'être lyophilisés et réduits en poudre. La poudre obtenue a été utilisée pour les différents tests.

c) Teneur en composés phénoliques dans l'eau de récolte : composés exsudés en fonction des sites d'échantillonnage chez *Sargassum muticum*

Afin de comparer la quantité de composés phénoliques exsudés dans les eaux de récolte de *Sargassum muticum* suivant le site de récolte, les latérales (crampon laissé en place) ont été récoltées au mois d'avril 2011 dans trois sites : Le Minou, Le Dellec et La pointe du diable (*cf.* Chapitre I). L'eau de mer de récolte (contenue dans le seau ayant servi au transport des algues) a été récupérée et concentrée par évaporation rotative. L'extrait aqueux obtenu a ensuite été lyophilisé afin d'en déterminer le poids sec puis des dosages ont été effectués sur cet extrait lyophilisé.

d) Etude de la variabilité inter individuelle : effet de l'âge et de la partie du thalle chez *Sargassum muticum*

Afin de mesurer l'effet de l'âge et/ou de la partie du thalle considérée sur la teneur en composés phénoliques chez *Sargassum muticum*, des individus ont été échantillonnés à différents âges sur le site de la pointe du diable (*cf.* Chapitre I). Pour déterminer le stade de développement et l'âge des individus, divers critères ont été pris en compte:

1) La taille des individus pour distinguer les différents stades de développement :

   -Recrues (Taille < 5 cm) ;

   -Juvéniles (Taille entre 5 et 10cm) ;

   -Thalles immatures (Taille entre 10 et 20cm) ;

   -Thalles adultes immatures (Taille > 20cm).

2) Le nombre de latérales et la forme des crampons pour différencier les individus suivant leur âge (Critchley, 1989).

NB : Structure en âge de la population :

Jephson et Gray (1997) ont mis en évidence que le nombre de latérales primaires augmentait avec l'âge de l'algue. Ensuite, Critchley (1989) a déterminé des classes d'âge pour l'espèce *Sargassum muticum* par rapport au nombre de latérales.

Ainsi, pour déterminer l'âge des individus de *S. muticum*, Zea (2012) a élaboré un classement par âge des individus avec une échelle plus petite que celle utilisée par Critchley (1989), en tenant compte, en plus, de la forme du crampon, comme le montre le Tableau IV.1.

Tableau IV.1. Classe d'âge utilisée pour la comparaison quantitative et qualitative des composés phénoliques, l'âge correspondant (d'après Critchley, 1989).

	Age correspondant							
	1 an		2 ans		3 ans		4ans	
Classe d'âge	1	2	3	4	5	6	7	8
Nb latérales	3	5	10	12	15	16	21	27
Epaisseur de l'axe principal (mm)	3	2.9	3	3	5.9	6	7	8
Hauteur de l'axe principal (cm)	1	1.8	2.8	3	4	4.5	6	6

IV.2.2.2. Obtention d'empreinte chimique par résonance magnétique nucléaire HR-MAS ou *in vivo*

Nous avons tenté de trouver une méthode rapide permettant de nous aider à observer de façon rapide l'évolution du profil chimique chez deux macroalgues au cours de l'année. Une partie de latérale a été introduite dans le rotor en présence d'un peu d'eau deutérée (D_2O). Les analyses *in vivo* de RMN ont été réalisées à l'aide d'une sonde HR-MAS 1H/31P sur le spectromètre BRUKER DRX Advanced 500 (500 MHz) (Service commun de RMN-RPE de l'UBO) (*cf.* Encadré I.1). Nous avons pu ainsi comparer les spectres obtenus pour les individus suivant la saison d'échantillonnage.

IV.2.2.3. Extraction de composés aromatiques

Les composés phénoliques ont été extraits par un mélange de méthanol-eau (50 :50, v:v) à raison de 1g d'algue lyophilisée et broyée pour 20mL de solvant d'extraction. L'extraction a été réalisée à 40°C pendant 3 heures, sous agitation (60 t/m) et à l'abri de la lumière. Les extraits ont ensuite été centrifugés à 4000 rpm pendant 15min à 4°C, puis filtrés sur coton de verre et finalement évaporés sous vide à l'aide d'un évaporateur. L'extraction des composés phénoliques s'est déroulée sur les différentes parties du thalle, les différents stades de développement et les individus d'âge différents de *Sargassum muticum*.

IV.2.2.4. Mesure de la teneur en composés phénoliques

La teneur totale en composés phénoliques (TPP) a été mesurée par le test colorimétrique de Folin-Ciocalteu décrit au chapitre I. Les données obtenues seront exprimées en % de la matière sèche de l'algue (noté : %MSalgue).

IV.2.2.5. Dosage des activités biologiques

Deux techniques permettant l'évaluation des activités biologiques ont été utilisées pour mesurer les activités anti-ROS des extraits obtenus : l'évaluation antiradicalaire utilisant le DPPH, la méthode du blanchiment du β-carotène (*cf.* Chapitre I).

IV.2.2.6. Analyse statistique des données

Toutes les analyses ont été effectuées en triplicat et les résultats sont présentés sous la forme de moyennes ± écart type. Le logiciel utilisé est Statistica 8 (StatSoft ®). L'homogénéité des variances est testée grâce au teste de Brown-Forsythe au risque d'erreur de 0.05. Lorsque les données satisfont bien aux critères de normalité et d'homoscédasticité des ANOVA à deux facteurs (pour les facteurs distincts tels que « site » et « mois ») ou des ANOVA imbriquées (nested en anglais) (pour les facteurs dépendants comme par exemple la variable «mois » comprise dans la variable « année ») ont été effectuées afin de mettre en avant l'effet des différents paramètres observés sur la teneur en composés phénoliques (TPP) et leurs activités anti-radicalaire (IC_{50}, DPPH test) et antioxydante (AAC_{700}, β-carotene bleaching test). Quand l'ANOVA montrait des différences significatives, un test *a posteriori* de Tukey HSD a été effectué. Pour les échantillons ne remplissant pas les conditions d'utilisation des tests paramétriques (normalité des distributions et homogénéité des variances), les comparaisons de moyennes ont été réalisées à l'aide des tests non paramétriques de Kruskal Wallis et de Wilcoxon.

IV.2.3. Résultats

IV.2.3.1. Etude de la variabilité saisonnière

D'après la Figure IV.1, on constate une variation significative de la teneur en composés phénoliques selon la période d'échantillonnage chez *Sargassum muticum* (Tukey HSD, $p<0.001$) (Tableau IV.2). La quantité de composés semble la plus faible aux mois de Septembre et Janvier (0.87 ± 0.15 et 0.50 ± 0.10%MS_{algue} en moyenne pour les mois de Septembre et Janvier, respectivement) tandis qu'elle est maximum au alentour du mois de Juillet (3.63 ± 0.59%MS_{algue} en moyenne) (Figure IV.1). Par ailleurs, l'année d'échantillonnage a également un effet significatif ($p<0.001$) : la teneur en CP est plus importante en 2011 ($p<0.001$) et particulièrement à partir du printemps (Tableau IV.2).

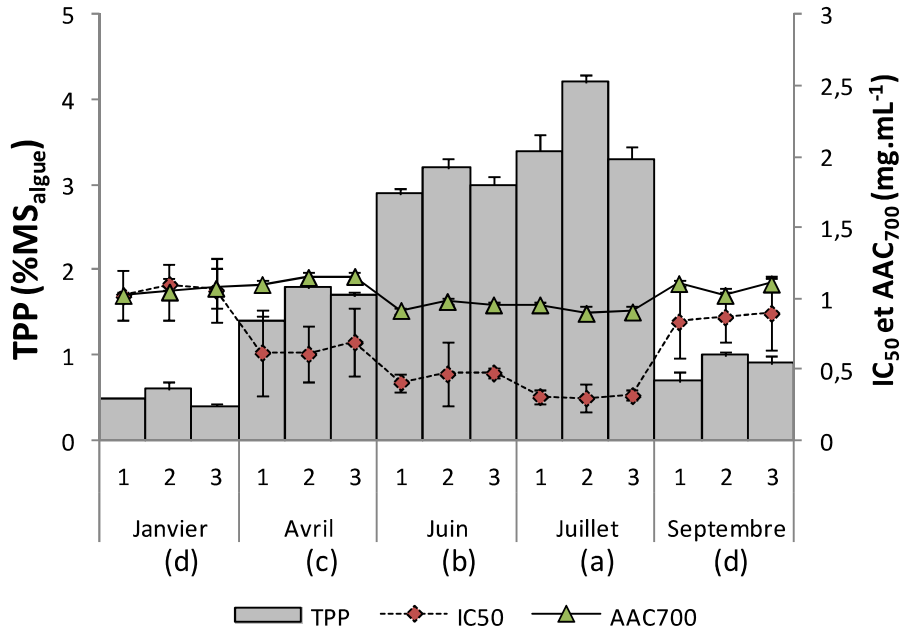


Figure IV.1. Teneurs en composés phénoliques (histogramme) et activités antiradicalaire et antioxydante avec la méthode DPPH (IC_{50}) et β-carotène (AAC_{700}) mesurées à différent mois sur 3 ans pour *Sargassum muticum*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type tandis que les lettres représentent les différences significatives (Tukey HSD, p<0.05) entre les mois d'échantillonnage pour les teneurs en CP (sans tenir compte de l'année).

Concernant l'activité anti-oxydante, l'AAC_{700} ne varie pas de façon significative (Tableau IV.2) selon la période d'échantillonnage pour la macroalgue *S.muticum* : ni l'année, ni le mois d'échantillonnage n'ont d'effet significatif sur les activités mesurées (p=0.901 et p=0.661 pour l'effet de l'année et l'effet du mois respectivement) (Tableau IV.2).

Tableau IV.2. Effet de la période d'échantillonnage sur les teneurs en composés phénoliques et les activités associées (anti-oxydantes et anti-radicalaires) chez *Sargassum muticum*

Variable	Test satistique		*S. muticum*	
			Année	Mois (Année)
TPP	Two-Way nested ANOVA	df	2	12
(%MS_{algue})		F	36.130	429.220
		p	*p<0.001*	*p<0.001*
IC_{50}	Two-Way nested ANOVA	df	2	12
(mg.mL^{-1})		F	2.137	58.088
		p	0.136	p<0.001
AAC_{700}	Two-Way nested ANOVA	df	2	12
(mg.mL^{-1})		F	0.104	0.785
		p	0.901	0.661

L'activité antiradicalaire, mesurée par l'IC_{50} est significativement différente (Tableau IV.2) selon les mois d'échantillonnages ($p<0.001$). En revanche l'année n'a pas d'effet significatif sur les activités antiradicalaires mesurées ($p=0.901$). Chez *S.muticum* le maximum d'activité est mesuré en Juillet (IC_{50} de 0.31 ± 0.01 $mg.mL^{-1}$) et le minimum en Janvier (IC_{50} de 1.06 ± 0.04 $mg.mL^{-1}$) (Figure IV.1). L'activité anti-radicalaire déterminée sur les extraits phénoliques et la quantité de composés présents sont plus importantes en été (augmentation à partir d'Avril).

Les spectres RMN *in vivo* présentés sur la Figure IV.2 montrent que les composés phénoliques sont visibles (et donc en proportion plus importante) à partir du mois d'Avril et jusqu'au mois de Juillet. On remarque en Septembre la présence de petits signaux dans la zone des composés aromatiques, mais, étant donné la présence d'épiphytes en quantité importante sur les thalles à cette période de l'année, ces signaux pourraient correspondre à des CP présent chez ces espèces épiphytes. Les tendances observées ici suivent celles mesurées par le dosage de Folin-Ciocalteu. On remarque une grande variabilité de la teneur en composés phénoliques chez *Sargassum muticum* au cours de l'année : cette teneur variant de 0.50 ± 0.10 à 3.63 ± 0.49 $\%MS_{algue}$.

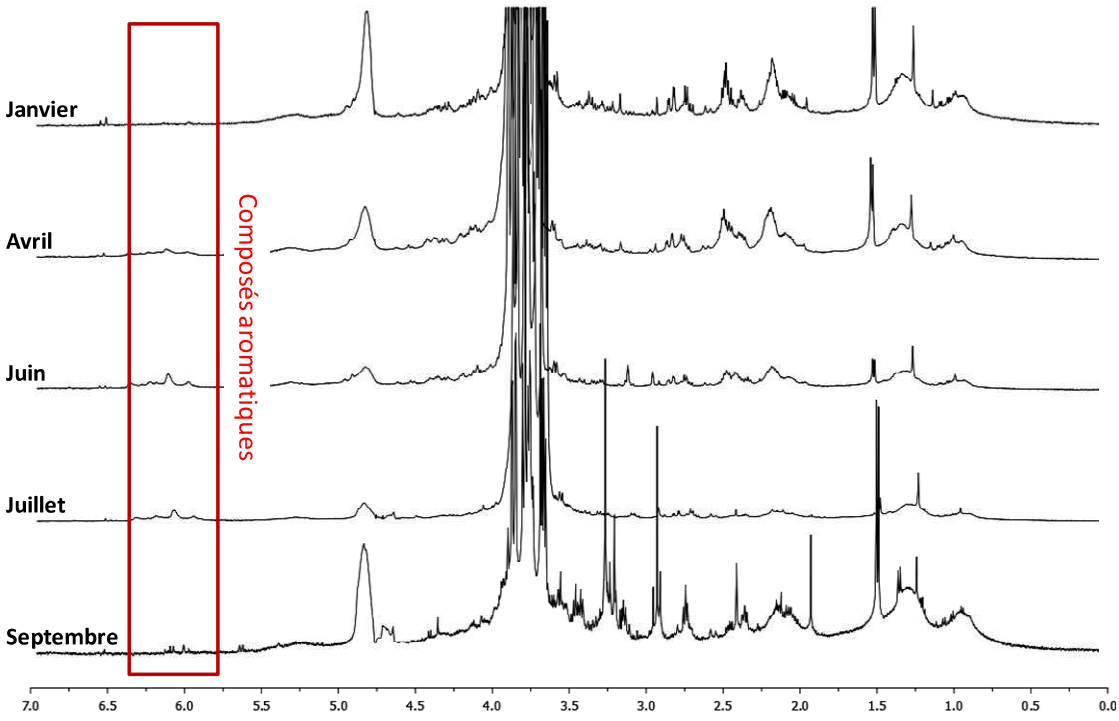


Figure IV.2. Spectres RMN HR-MAS sur des morceaux de thalle de *Sargassum muticum* lyophilisés. La zone encadrée correspond à la zone des composés aromatiques.

IV.2.3.2. Variabilité spatiale de la teneur en composés phénoliques chez *S.muticum* suivant le site d'étude en Bretagne

D'après la Figure IV.3, on constate une variation significative de la teneur en composés phénoliques chez *Sargassum muticum* selon le site d'échantillonnage et selon le

mois d'échantillonnage ($p<0,001$) (Tableau IV.3) ; un effet croisé du mois et du site d'échantillonnage est également mis en évidence. Quel que soit le mois considéré, la quantité de composés phénoliques chez *Sargassum muticum* est la plus faible sur le site du Minou et la plus importante à la Pointe du diable. En revanche, les teneurs en CP semblent évoluer de la même manière, en fonction de la saison, quel que soit le site, avec un maximum de CP observé au cours de l'été, en juillet (3.27 ± 0.72%MS_{algue} en moyenne) et un minimum en automne et durant l'hiver (0.68 ± 0.29 et 0.62 ± 0.28%MS_{algue} en automne et en hiver en moyenne) (Figure IV.3).

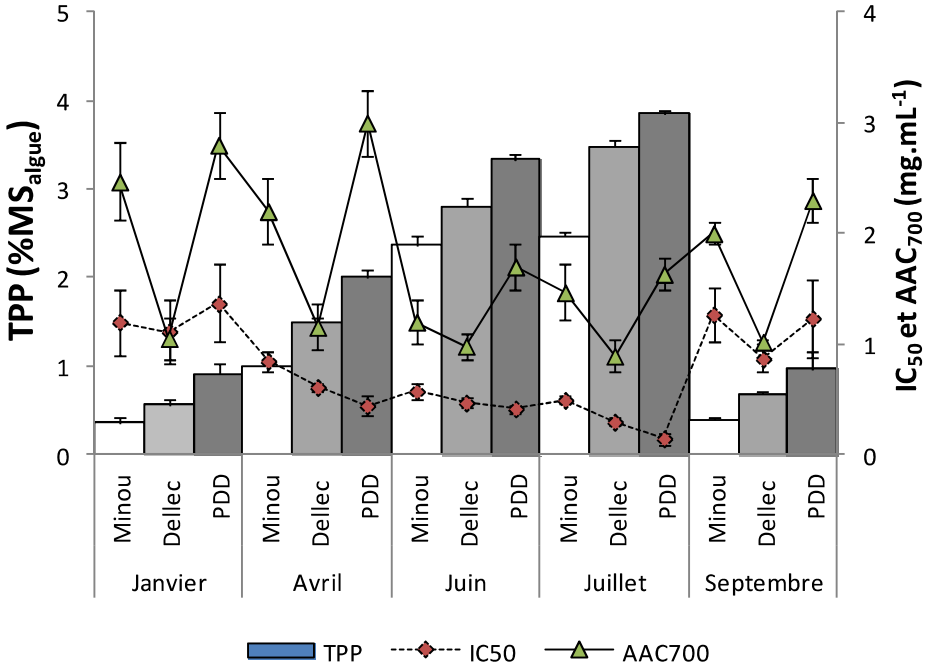


Figure IV.3. Teneurs en composés phénoliques (histogramme) et activités antiradicalaire et antioxydante avec la méthode DPPH (IC_{50}) et β-carotène (AAC_{700}) mesurées pour les différents stades de développement de *S. muticum*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type (n=3).

Tableau IV.3. Effet de la période d'échantillonnage sur les teneurs en composés phénoliques et les activités associées (anti-oxydantes et anti-radicalaires)

Variable	Test satistique		Facteurs fixes		
			Mois	Site	Mois*Site
TPP	Two-Way ANOVA	df	4	2	8
(%MS_{algue})		F	1709.13	383.93	14.75
		p	*p<0.001*	*p<0.001*	*p<0.001*
IC_{50}	Two-Way ANOVA	df	4	2	8
(mg.mL^{-1})		F	36.994	4.189	1.786
		p	*p<0.001*	0.025	0.119
AAC_{700}	Two-Way ANOVA	df	4	2	8
(mg.mL^{-1})		F	20.479	79.402	5.554
		p	*p<0.001*	*p<0.001*	*p<0.001*

En ce qui concerne l'activité antioxydante, l'AAC_{700}, elle varie de façon significative entre les sites d'échantillonnages et suivant le mois de récolte ($p<0.001$) (Tableau IV.3). On observe également un effet croisé de ces deux paramètres ($p<0.001$) (Tableau IV.3). Cette activité est toujours plus importante dans les extrais obtenus à partir des algues provenant du site du Dellec quel que soit la saison : avec un AAC_{700} minimum de 0.89 ± 0.04 mg.mL^{-1} au mois de Juillet et un AAC_{700} maximum de 1.15 ± 0.04 mg.mL^{-1} au mois d'Avril (Figure IV.3). Elle est la plus faible dans les extrais obtenus à partir des algues provenant du site de la Pointe du Diable : avec un AAC_{700} minimum de 1.70 ± 0.04 mg.mL^{-1} au mois de Juillet également et un maximum de 3.00 ± 0.09 mg.mL^{-1} au mois de Janvier (Figure IV.3).

L'activité anti-radicalaire, mesurée par l'IC_{50} est significativement différente selon les sites étudiés ($p=0.025$) (Tableau IV.3) avec un maximum d'activité enregistré sur les fractions obtenues à partir des algues issues de la pointe du diable (IC_{50} de 0.72 ± 0.54 mg.mL^{-1} en moyenne sur toute l'année) et un minimum obtenu pour les exemplaires provenant du site du Minou (IC_{50} de 0.88 ± 0.35 mg.mL^{-1} en moyenne sur toute l'année) (Figure IV.3). Cette activité varie significativement suivant le mois de récolte avec un maximum obtenu en Juillet (IC_{50} de 0.31 ± 0.17 mg.mL^{-1} en moyenne sur les trois sites) et un minimum obtenu en Janvier et Septembre (IC_{50} de 1.23 ± 0.19 et 1.12 ± 0.22 mg.mL^{-1} en moyenne sur les trois sites pour Janvier et septembre, respectivement) (Figure IV.3). On observe par ailleurs sur la figure IV.3 que l'activité des composés commence à croitre au printemps conjointement à l'augmentation de la teneur en CP dans les algues.

IV.2.3.3. Teneur en composés phénoliques dans l'eau de récolte : composés exsudés en fonction des sites d'échantillonnage

La figure IV.4 présente les teneurs en composés phénoliques exprimées en %MS de la fraction obtenue, après extraction, à partir des algues ou dans l'eau restant dans les seaux après récolte. On remarque que cette portion de composés exsudés en trois heures de temps est certes faible mais non négligeable puisque, quel que soit le site considéré, elle représente plus de 0.36% de la matière sèche contenue dans l'eau (soit environ 1.2 mg.gMS^{-1}.h^{-1}). Cette fraction représente toujours environ 3% de la teneur en CP de l'algue quel que soit le site d'échantillonnage.

En ce qui concerne l'activité antioxydante, l'AAC_{700} est toujours moins important dans les fractions issues des algues (de 1.15 ± 0.04 mg.mL^{-1} à 3.00 ± 0.04 mg.mL^{-1} suivant les sites d'échantillonnage) (Figure IV.4). L'activité mesurée dans l'eau de récolte est moins importante (de 2.70 ± 0.06 mg.mL^{-1} à 3.60 ± 0.06 mg.mL^{-1} suivant les sites d'échantillonnage) (Figure IV.4).

L'activité antiradicalaire, mesurée par l'IC_{50} est également plus importante dans les fractions issues des algues (de 0.44 ± 0.03 mg.mL^{-1} à 0.85 ± 0.04 mg.mL^{-1} suivant les sites d'échantillonnage) (Figure IV.4). L'activité mesurée dans l'eau de récolte est quant à elle bien faible par rapport à celle des témoins positifs (BHA, BHT) : les fractions sont donc considérées comme inactives.

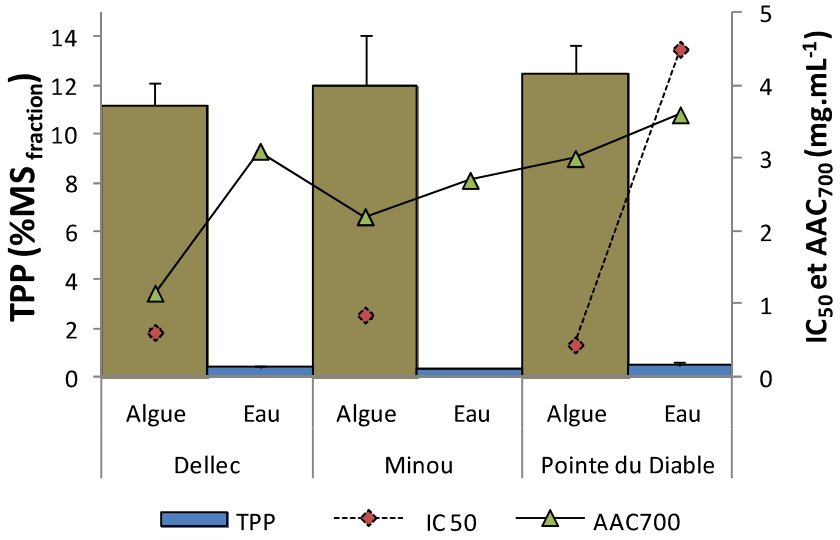


Figure IV.4. Teneurs en composés phénoliques (histogramme) et activités antiradicalaire et antioxydante avec la méthode DPPH (IC_{50}) et β-carotène (AAC_{700}) mesurées dans les algues et dans l'eau de récolte chez S.muticum au mois d'Avril 2011 de *S. muticum*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type (n=3).

IV.2.3.4. Variabilité inter individuelle : effet de l'âge et de la partie du thalle chez *Sargassum muticum*

a) Effet du stade de développement

D'après la Figure IV.5, on constate une variation significative de la teneur en composés phénoliques selon le stade de développement des algues (Kruskal-Wallis, $p<0.001$). Les juvéniles présentent la teneur la plus faible en composés phénoliques (1.81 ± 0.51 %MS) tandis que les adultes, dont la taille est supérieure à 20cm, présentent les teneurs les plus importantes (5.15 ± 0.07 %MS). En revanche la teneur moyenne mesurée chez les recrues et les adultes dont la taille est inférieure à 20 cm sont respectivement de 3.62 ± 0.05 %MS et 3.37 ± 0.30 %MS, valeurs qui sont significativement différentes (Wilcoxon, $p=0.028$).

Concernant l'activité antioxydante, l'AAC_{700} varie de façon significative suivant le stade de développement des algues (Figure IV.5, Kruskal-Wallis, $p<0.001$), il n'y a pas de différence significative entre les teneurs mesurées chez les juvéniles et celles mesurées chez les adultes >20cm (Wilcoxon, $p=0.33$), ainsi qu'entre les recrues et les adultes <20cm (Wilcoxon, $p=0.44$).

L'activité antiradicalaire, mesurée par l'IC_{50} est significativement différente selon les stades de développement des algues (Figure IV.5, Kruskal-Wallis, $p<0.001$). En revanche, les IC_{50} mesurés sur les extraits obtenus à partir des juvéniles, des Adultes<20cm et des Adultes>20cm (Wilcoxon, $p=0.799$ et $p=0.348$, respectivement) ne sont pas significativement

différents. Les deux activités déterminées sur les extraits phénoliques (antiradicalaire et antioxydante) suivent une même tendance, avec une activité plus importante chez les recrues.

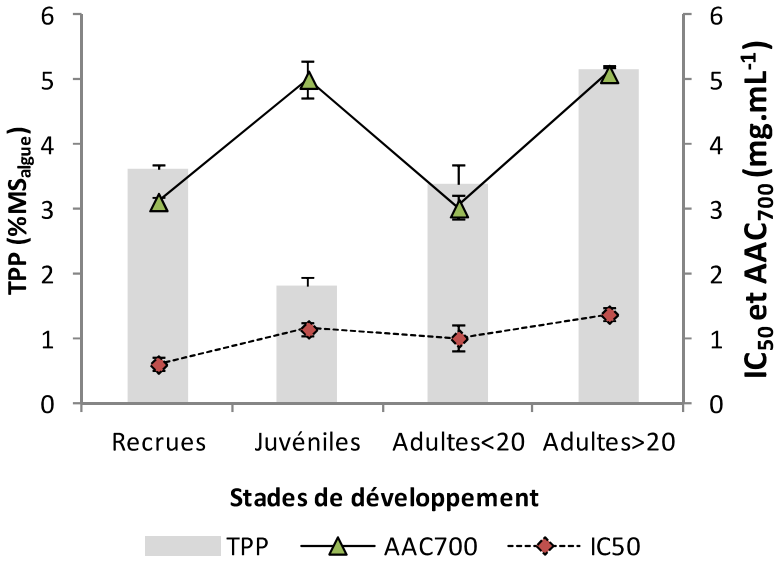


Figure IV.5. Teneurs en composés phénoliques (histogramme) et activités antiradicalaire et antioxydante avec la méthode DPPH (IC_{50}) et β-carotène (AAC_{700}) mesurées pour les différents stades de développement de *S. muticum*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type (n=3).

b) Effet de l'âge et de la partie constituante de l'algue

Les teneurs en composés phénoliques mesurées dans les crampons et au niveau des latérales de l'algue sont significativement différentes (Figure IV.6, Kruskal-Wallis, $p<0.001$) avec une moyenne respective de 5.73 ± 1.51 %MS et 2.47 ± 0.42 %MS. Plus l'individu est d'un âge avancé, plus la teneur en composés phénoliques augmente au niveau du crampon ($r=0.952$, $p<0.001$). Au contraire aucune relation entre les teneurs en composés phénoliques des latérales et l'âge de l'individu n'a pu être mise en évidence.

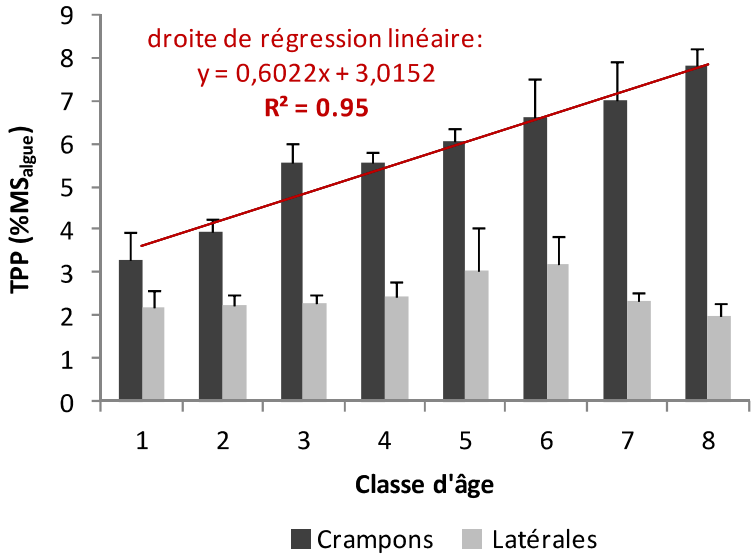


Figure IV.6. Variation intra-thalle des teneurs en composés phénoliques chez *S muticum* (crampons et latérales) et sur différents individus appartenant à différentes classes d'âge. Les barres indiquent l'intervalle de confiance à 95%.

En ce qui concerne l'activité antioxydante (AAC_{700}), il existe une différence significative (Figure IV.7, Kruskal-Wallis, $p<0.001$) entre les teneurs mesurées dans les crampons et celles mesurées dans les latérales avec une moyenne respective de 0.19 ± 0.08 $mg.mL^{-1}$ et 0.42 ± 0.21 $mg.mL^{-1}$: les composés contenus dans les crampons sont les plus actifs. Cependant il n'y a pas de différence significative entre les individus appartenant aux classes d'âge 6 et 7. Cette activité varie significativement en fonction de l'âge des individus (Kruskal-Wallis, $p<0.001$), ceci pour les deux parties testées (crampon et latérale). En effet, lorsque l'âge des individus augmente, les extraits obtenus ont un pouvoir antioxydant plus élevé (Figure IV.7). En ce qui concerne les extraits obtenus à partir des latérales, on observe une augmentation progressive de l'activité des extrais obtenus jusqu'à ce que l'individu atteigne la classe d'âge 7, puis une forte diminution entre les classes d'âge 7 et 8. L'activité la plus élevée se retrouve chez les individus de classe d'âge 6 et 7. Si l'on compare avec les activités obtenues pour les témoins positifs testés (BHA, BHT, Vit. C, et Vit. E) et utilisés à une concentration de 2.5$g.L^{-1}$, les extraits provenant des crampons des individus des classes d'âge 5 à 8, ainsi que ceux des latérales d'individus de classes d'âge 6 et 7, ont une activité plus élevée.

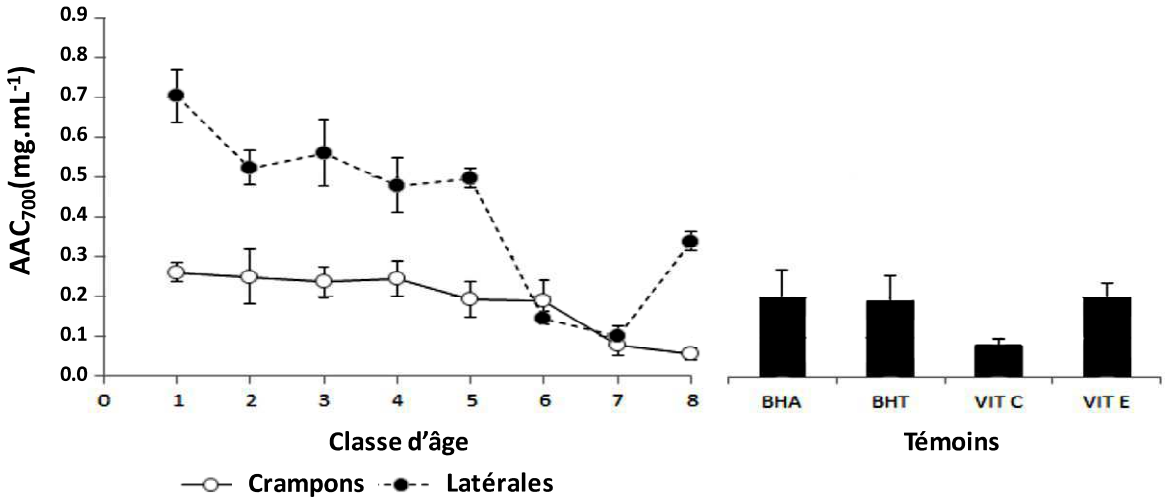


Figure IV.7. Variations intra-thalle (crampons versus latérales) et en fonction de l'âge des individus de l'activité antioxydante (AAC_{700}) chez *S. muticum*. Classement des individus des moins âgés aux plus âgés : 1→8. Les barres indiquent l'intervalle de confiance à 95%.

L'activité antiradicalaire IC_{50} moyenne obtenue pour les extraits à partir des crampons (1.36 ± 0.72 $mg.mL^{-1}$) et des latérales (4.67 ± 0.70 $mg.mL^{-1}$) est significativement différente (Figure IV.8, Kruskal-Walis, $p<0.001$). L'extrait provenant des crampons est toujours plus actif par rapport à celui des latérales. On remarque une variation significative de cette activité dans les crampons en fonction de l'âge des individus (Figure IV.8, Kruskal-Wallis, $p<0.0001$) : l'activité diminue légèrement entre les individus de classes d'âge 1 et 3, avec ensuite une reprise du pouvoir antiradicalaire au fur et à mesure que l'âge augmente. En revanche, pour les latérales, aucune relation significative ne semble exister entre l'activité mesurée et la classe d'âge. En effet l'activité antiradicalaire dans les latérales augmente entre les individus de classes d'âge 1 et 2, diminue entre les individus de classes 2 et 3, augmente fortement entre les individus de classes 3 et 5 pour finalement diminuer entre les individus de classes d'âge 5 et 8. Si l'on compare les activités obtenues pour les extraits et les témoins positifs (BHA,

BHT, Vit. C, et Vit. E utilisés à une concentration de 2.5 $g.L^{-1}$), les extraits obtenus à partir des crampons des individus de classes d'âge 5, 6, 7 ,8 ont une activité plus élevée que celle des témoins.

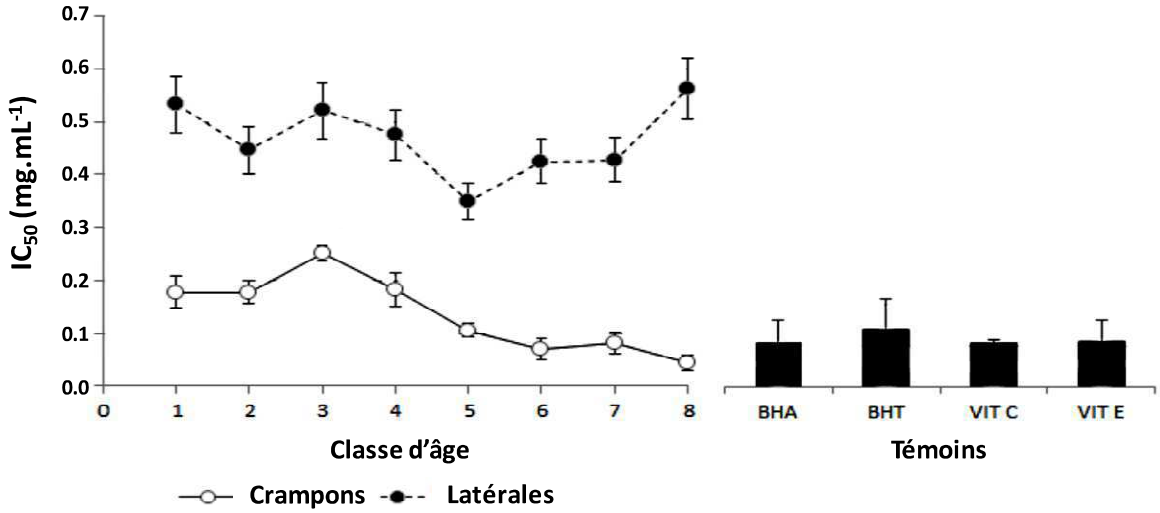


Figure IV.8. Variations intra-thalle (crampons versus latérales) et en fonction de l'âge des individus de l'activité antiradicalaire (IC_{50}) chez *S. muticum*. Classement des individus des moins âgés aux plus âgés : 1→8. Les barres indiquent l'intervalle de confiance à 95%.

IV.2.4. Discussion

IV.2.4.1. Etude de la variabilité saisonnière

Les teneurs en composés phénoliques chez *Sargassum muticum* varient d'une saison à l'autre. Les teneurs observées sont proches de celles obtenues par d'autres auteurs, ainsi, dans la littérature, les teneurs rapportées au printemps varient de 0,12 à 6.2 %MS, en été de 0.21 à 3%MS suivant les sites étudiés et en hiver de 0.10 à 1.5%MS (Plouguerné *et al*., 2006 ; Le Lann, 2009). On remarque par ailleurs, dans la littérature, l'extrême variabilité des teneurs suivant les auteurs, les études et les sites. Les teneurs maximales sont atteintes, chez *Sargassum muticum,* entre la fin du printemps et le milieu de l'été, suivant les auteurs (Plouguerné *et al*., 2006 ; Le Lann, 2009) ce qui correspond à sa période de reproduction. L'augmentation de la teneur en CP est initiée aux alentours du printemps ce qui confirme l'hypothèse du rôle photoprotecteur des phlorotannins déjà mis en évidence par de nombreux auteurs (Pavia *et al.,* 1997 ; Henry et Van Alstyne, 2004 ; Fairhead *et al.,* 2006 ; Abdala-Díaz *et al.,* 2006 ; Plouguerné *et al.,* 2006). Les fortes teneurs en polyphénols observées durant les périodes de reproduction, chez *Sargassum muticum* semblent indiquer leur rôle dans la protection des réceptacles et des zygotes en cours d'incubation contre les herbivores par exemple. En effet, les composés phénoliques sont connus pour avoir une action repoussante vis-à-vis des brouteurs (Amsler et Fairhead, 2006 pour synthèse). D'autres paramètres du milieu peuvent par ailleurs expliquer cette variabilité saisonnière, comme par exemple la salinité, la température de l'eau ou encore l'intensité lumineuse (Le Lann, 2009).

En ce qui concerne les activités anti-radicalaires, celles-ci sont maximales également en été dans les extraits. Ces résultats sont, pour *Sargassum muticum,* comparables à ceux obtenus dans d'autres études (Le Lann, 2009). L'activité biologique des composés serait donc bien liée à la fonction de reproduction. Ainsi, *S. muticum* semble assurer la protection de ses latérales fertiles, et par là-même, assurer sa dispersion, en produisant des composés de défense.

L'activité antioxydante des échantillons semble très peu sensible aux variations saisonnières. Chez *Sargassum muticum,* ni la saison ni l'année d'échantillonnage n'ont d'effet significatif sur l'activité des extraits. Les variations de l'activité antiradicalaire ne suivent pas la même tendance que celles de la teneur en composés phénoliques.

IV.2.4.2. Variabilité spatiale de la teneur en composés phénoliques chez *S.muticum* sur la pointe bretonne suivant le site d'étude

La variabilité spatiale mise en évidence lors de cette étude vient confirmer les constats établis par d'autres auteurs dans de nombreuses études (Connan, 2004 ; Plouguerné, 2006 ; Le Lann, 2008 ; Jégou, 2012). En effet, la pointe bretonne et les sites échantillonnés ont déjà fait l'objet de nombreux travaux au laboratoire. Les travaux de Le Lann (2009) traitent d'ailleurs de la variabilité spatiale de la Sargasse en Bretagne. Il s'agissait ici d'avoir un suivi supplémentaire pour l'année 2011et de voir, si les tendances étaient confirmées. Les teneurs en CP sont significativement plus importantes dans les algues provenant du site de La Pointe du diable. Ce qui peut s'expliquer par l'hydrodynamisme plus important, et donc, par une exposition plus importante au stress mécanique pour les algues ou encore par la nature du substrat, rocheux, favorable à la croissance des thalles (Van den Hoeck, 1978 ; Hay, 1981 ; De Paula et de Oliveira, 1982 ; Ang, 1986 ; Stiger et Payri, 1999a,b ; Plouguerné, 2006). Une étude effectuée par Le Lann *et al*. (2012a) montrent d'ailleurs, pour cette même espèce, une plus grande quantité de CP en été dans les algues provenant de site battu par rapport à celles provenant de site abrité. Les thalles ayant une croissance plus active, pourraient devenir matures plus rapidement et donc nécessiter une protection accrue par rapport aux individus provenant d'autres sites et qui ne seraient pas encore en reproduction à cette même période. Ce probable effet de l'hydrodynamisme est confirmé par le fait que les teneurs les plus faibles sont retrouvées dans les algues provenant du site du Minou, site abrité et sableux, où l'hydrodynamisme est le plus faible. Logiquement, les algues provenant du site du Dellec, de mode semi-exposé grâce à la protection fournie par la presqu'île de Crozon, présentent des teneurs moyennes en composés phénoliques. Par ailleurs il aurait été intéressant d'effectuer le même suivi une autre année afin de visualiser l'effet croisé du site d'échantillonnage et de la saison. En effet, Le Lann (2009) a déjà montré que les variations saisonnières étaient significativement dépendantes de l'année d'échantillonnage.

IV.2.4.3. Teneur en composés phénoliques dans l'eau de récolte : composés exsudés en fonction des sites d'échantillonnage

Notre étude a permis de mettre rapidement en avant, la présence de composés exsudés ou excrétés durant le transport des thalles après récolte sur le terrain. Cette quantité de composés est faible mais pourtant non négligeable. Certains auteurs ayant même mis en évidence une saisonnalité dans les taux excrétés ou exsudés (Ragan et Glombitza, 1986). Par ailleurs, les taux d'exsudation mesurés différent énormément suivant les conditions de mesures. En effet, suivant les études retrouvées dans la littérature, ce taux peut être compris entre 5.5 $\mu g.g^{-1}MS.h^{-1}$ sur le terrain et plusieurs centaines de $\mu g.g^{-1}MS.h^{-1}$ en laboratoire (Jennings et Steinberg, 1994). Dans cette étude, le taux mis en évidence est même de l'ordre de plusieurs $mg.g^{-1}MS.h^{-1}$ ce qui est plutôt important. Il aurait été intéressant d'isoler les composés exsudés ou de passer cette fraction en RMN afin de voir si le profil des composés aromatiques la composant était semblable à ceux habituellement retrouvés dans le thalle.

IV.2.4.4. Variabilité inter individuelle : effet du stade de développement, de l'âge et de la partie du thalle

a) Effet du stade de développement

Notre étude a montré que suivant son stade de développement *Sargassum muticum* ne produit pas les mêmes quantités de composés phénoliques. La production de composés phénoliques induit un coût énergétique non négligeable pour les algues, ce qui augmente la demande métabolique et la demande en nutriments, et fait baisser le taux de croissance (Hay et Fenical, 1988 ; Steinberg, 1995). Ainsi, les résultats obtenus nous permettent de faire l'hypothèse que *Sargassum muticum* limite ses ressources d'énergie pour les partitionner entre les différentes fonctions essentielles comme la croissance, la reproduction et la défense. Les résultats de la Figure IV.5 indiquent que les teneurs moyennes en composés phénoliques varient de la façon suivante : TTP des adultes de plus de 20cm > TTP des recrues > TTP des adultes de moins de 20cm >TTP des juvéniles. Ceci suggère que les recrues, en pleine croissance, vont favoriser cette fonction, au détriment de leur défense chimique, afin de pouvoir rapidement s'implanter sur le site. Par contre, les juvéniles, une fois installés, utilisent leur énergie pour leur croissance. Les adultes de moins de 20 cm utilisent leur énergie pour la défense et pour la croissance. En effet, les individus de *Sargassum muticum* ayant une taille entre 9 et 22 cm (Zea, 2011) commencent à développer des aérocystes qui permettent à l'algue de se dresser dans la colonne d'eau afin de mieux capter la lumière, et d'éviter d'être sous le couvert d'autres espèces d'algues (les laminaires par exemple) et ainsi d'être privée d'énergie lumineuse. Elles sont donc exposées aux radiations lumineuses. Pavia *et al.* (1997) ont montré que les algues brunes produisent des composés phénoliques impliqués dans les mécanismes de photoprotection qui sont particulièrement efficaces pour lutter contre l'effet cytotoxique des radiations UV. Les adultes de plus de 20 cm présentent une forte teneur en composés phénoliques qui peut constituer un moyen de protection, contre les brouteurs par exemple, non seulement pour les gamètes présents dans les réceptacles, mais également pour les zygotes pendant l'incubation zygotique (Stiger et Payri, 1999a,b). Cette protection localisée des

recrues par les thalles parentaux a déjà été montrée dans le cas d'espèces de Sargassaceae tropicales (Stiger *et al.,* 2004). En ce qui concerne l'activité antioxydante (AAC_{700}), même si les thalles adultes de plus de 20 cm contiennent beaucoup plus de composés phénoliques que les recrues et les adultes de moins de 20 cm, ce sont les composés de ces deux derniers groupes qui sont les plus antioxydants. La relation négative entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante chez les adultes de plus de 20 cm peut résulter d'une variation structurale du pool des phénoliques ou de la quantité élevée d'autres molécules antioxydantes dans l'extrait comme l'ont suggéré Lim *et al.* (2002). En revanche, l'activité antiradicalaire IC_{50} des extraits est positivement corrélée aux teneurs en composés phénoliques mesurées. Ainsi l'activité antiradicalaire mesurée dans les extraits proviendrait bien des composés phénoliques. Cette affirmation est en accord avec l'étude réalisée par Jiménez- Escrig *et al.* (2001) qui ont montré que l'activité antiradicalaire mesurée par DPPH est étroitement liée au contenu phénolique chez les algues brunes. Cependant, certains auteurs considèrent que la capacité de protection des composés chez les algues brunes dépend plutôt d'autres métabolites secondaires (Deal *et al.,* 2003).

b) Age et partie constituante du thalle

Selon les résultats de la Figure IV.6, on voit une variation nette entre la teneur en composés phénoliques des crampons et celles mesurées dans les latérales, la plus importante teneur étant celle mesurée sur les crampons. Une étude réalisée en 2006 ne montrait pas de différences significatives entre les différentes parties du thalle chez *Sargassum muticum* (Connan, 2006) même si, en été, les teneurs mesurées dans les crampons étaient légèrement supérieures à celles mesurée dans les latérales. Dans notre étude, nous avons mis en évidence une relation positive entre les teneurs en composés phénoliques et l'âge des tissus, relation déjà montrée pour les algues brunes *Laminaria digitata et L. hyperborea* (Connan *et al.,* 2006). Les tissus âgés contiennent plus de composés phénoliques que les tissus jeunes. En effet, le crampon peut accumuler des composés phénoliques pour permettre une protection contre les brouteurs tandis que les latérales utilisent plutôt leur énergie pour grandir. De même, les latérales de *S. muticum*, souples et flexibles, portant des frondes, ont une morphologie qui permet à l'espèce de se protéger de façon mécanique contre les brouteurs comme l'ont démontré Stiger *et al.* (2004) pour une espèce tropicale. Les teneurs les plus importantes mesurées dans les crampons peuvent aussi s'expliquer par le rôle des composés phénoliques dans la fixation, bien que ce rôle n'ait été montré que dans le cas de zygotes de Fucales (Schoenwaeldaer et Clayton, 1998b).

Par ailleurs, les tissus les plus exposés au broutage mais ayant une importance majeure pour la survie de l'algue devraient logiquement accumuler davantage de composés de défense (Rhoades, 1979). En accord avec Tugwell et Branch (1989), il semble plus important pour le développement de l'algue que ces composés de défense se concentrent au niveau du crampon plutôt que dans les méristèmes ou tissus reproducteurs. Toth et Pavia (2002) ont mis en évidence des variations significatives dans les teneurs en composés phénoliques: variations interspécifiques, intra-spécifiques mais aussi entre individus, ce qui se confirme dans notre étude. En effet, la teneur en composés phénoliques dans les crampons varie entre les individus

d'âges différents. La présence d'une grande quantité de composés phénoliques dans les crampons matures pourrait s'expliquer par le fait que dès le plus jeune âge, ils sont des cibles faciles pour les prédateurs ; cette sécrétion beaucoup plus importante de composés phénoliques permettrait de résister au broutage. Donc, il existe probablement une relation entre la production de composés et l'âge. Des études ont montré une différence dans les préférences des herbivores pour les tissus jeunes par rapport aux tissus adultes. Les propriétés physico-chimiques des tissus affectent la préférence de l'herbivore. Les juvéniles sont par exemple riches en azote et présentent également un faible ratio C:N qui peut influencer le choix de beaucoup d'herbivores qui sont considérablement limités en azote (Mattson, 1980). Une autre hypothèse est la préférence de nourriture des herbivores qui changerait selon les différentes demandes nutritionnelles et la tolérance à la défense chimique des algues. C'est le cas pour le régime d'alimentation du mollusque *Tegula fenebralis* du Pacifique Est qui est affecté par la concentration en phlorotannins (Steinberg *et al.,* 1995) tandis que les petits herbivores utilisent plutôt l'algue comme habitat ou comme source de nourriture, selon leur tolérance aux défenses chimiques de l'algue (Hay *et al.,* 1989). La différence de production de composés phénoliques obtenue entre crampons et latérales pourrait être expliquée par le fait que *Sargassum muticum* perd ses latérales en été, alors que le crampon se maintient tout au long de la vie de l'individu ; il peut donc y avoir une accumulation de composés phénoliques dans le crampon. Une autre hypothèse envisageable est que la défense mécanique, diminuée par la perte des latérales en fin de période estivale chez *S. muticum*, provoque une production de composés phénoliques plus importante dans les crampons. Riipi *et al.* (2004) ont déjà mis en évidence cette variation de teneur en composés phénoliques par rapport à l'âge, indiquant une variation de composés entre frondes matures et frondes jeunes. Ils ont montré également qu'à partir d'un certain âge, il existe une stabilisation de la teneur. C'est pour cette raison qu'il serait intéressant de tester des individus plus âgés afin de vérifier ou non cette stabilisation. Concernant l'activité antioxydante (AAC_{700}) et antiradicalaire (IC_{50}), la différence significative toujours plus importante entre les composés issus des crampons et latérales pourrait s'expliquer par le besoin de protection de *Sargassum muticum*. Les composés de défense possédant des activités anti-ROS chez cette espèce serait donc localisés dans le crampon, partie pérenne contrairement aux latérales qui sont caduques et qui, à la saison estivale prochaine, se développeront à nouveau. L'activité antioxydante (AAC_{700}) est la même dans l'ensemble de l'individu (crampons et latérales) de classes d'âge 6 et 7 malgré la différence significative des teneurs en composés phénoliques. Ceci pourrait s'expliquer par le nombre plus élevé de latérales chez les individus les plus âgés. On sait qu'il existe une relation négative entre le nombre des latérales et la taille moyenne de l'individu (Arenas *et al.,* 2002). Au fur et à mesure que le nombre de latérales augmente, la taille moyenne diminue. Chaque latérale présenterait donc une concentration plus élevée de métabolites secondaires leur permettant une activité plus importante. La différence qui existe entre les deux activités associées aux composés phénoliques par rapport aux parties constituantes du thalle et l'âge des individus pourrait provenir de différences qualitatives des composés phénoliques (Koleva *et al.,* 2002). En effet, ces auteurs ont montré les composés responsables de l'activité antioxydante sont majoritairement lipophiles (pigments apolaires, lipides neutres, acides gras, phospholipides, etc). Leur étude a prouvé que l'activité antioxydante dépend des substrats employés et aussi de l'influence de l'acide linoléique utilisé dans la méthode β-carotène sur les

degrés de dissociation des antioxydants acides. De plus, il a été démontré que la production de composés phénoliques polaires demanderait moins d'énergie que pour la production de métabolites secondaires lipophiles (Fox, 1981).

IV.2.5. Conclusion

Dans ce paragraphe IV.2, nous avons montré que les teneurs en composés phénoliques de *Sargassum muticum* variaient quantitativement et qualitativement en fonction de plusieurs paramètres (variabilité spatiale et temporelle) et ce, à différentes échelles. Cette étude a permis de confirmer les résultats précédemment obtenus dans d'autres études. De plus nous avons vu que cette variabilité peut s'observer entre individus ou au sein d'un même individu, la teneur en composés phénoliques variant suivant les différentes parties du thalle. En effet, cette étude apporte des données supplémentaires sur la variation de la teneur en composés phénoliques due à l'effet du stade de développement selon lequel *Sargassum muticum* partitionne son énergie pour les fonctions essentielles. Il y a aussi un effet "âge des individus" qui est prouvé pour la première fois chez *Sargassum muticum*, et qui pourrait expliquer pourquoi il existe tant de variations entre les individus. On remarque également un effet "partie constituante" du thalle qui montre une teneur plus haute dans les crampons que dans les latérales due à une stratégie de défense.

Ces stratégies de défense chimique conduisent à la production de composés actifs présentant des activités antiradicalaires intéressantes et potentiellement valorisables par les industries. La recherche de ces composés chimiques et leur purification à des fins de valorisation et/ou de compréhension de leur mode de production dans l'environnement est un domaine qui nous a intéressé. Ces travaux font l'objet d'une étude présentée au paragraphe suivant faisant état de la valorisation de *Sargassum muticum* en Europe.

IV.3. Séparation et semi-purification des composés phénoliques

IV.3.1.Introduction

Dans ce paragraphe nous avons étudié différentes sources de variabilités pouvant influer sur la teneur en composés de défense chimique et en particulier en composés phénoliques (*cf.* Chapitre I) chez *Sargassum muticum* dans le reste de l'Europe. Ces composés chimiques sont synthétisés pour faire face à des prédateurs, des brouteurs, des pathogènes et autres compétiteurs (Amsler et Fairhead, 2006 ; Chapitre I) et/ou aux variations de leur environnement. Généralement les molécules impliquées dans l'écologie chimique et plus particulièrement dans la défense chimique appartiennent au métabolisme secondaire. On les appelle soit métabolites secondaires, soit substances naturelles (*natural products* en anglais). Cela permet de les distinguer des composés ayant un rôle dans le métabolisme primaire au sein des cellules de nombreux taxons (Amsler et Fairhead, 2006). Cependant, certains métabolites, tels les composés phénoliques sont des exceptions car ils sont susceptibles d'intervenir aussi bien au niveau primaire que secondaire. Par ailleurs ces composés sont

connus pour varier énormément en quantité et en qualité suivant de nombreux paramètres (*cf.* Chapitre I) ce qui rend la distinction de leurs différents rôles plutôt difficile.

Les phlorotannins présentent de nombreux intérêts (*cf.* Chapitre I). Il s'agit de molécules ayant de nombreuses applications médicales, pharmaceutiques et en cosmétologie notamment. Nous avons vu précédemment que les principales macromolécules présentes chez *Sargassum muticum* pouvaient varier en quantité et en qualité suivant la provenance des algues échantillonnées (*cf.* Chapitres II et III et Tanniou *et al*., 2013b). La caractérisation des phlorotannins s'inscrit dans le programme de recherches Phlorotann-ING (*cf.* Introduction générale du manuscrit), dont les attentes majeures sont, pour la partie « chimie » du projet, le développement et l'optimisation d'un protocole de purification des phlorotannins.

La deuxième étape de ce volet vise, par conséquent, à caractériser et isoler les fractions les plus actives de phlorotannins synthétisés par *Sargassum muticum* pouvant intéresser divers secteurs industriels (cosmétique, parapharmacie, thalassothérapie). Afin d'isoler et de concentrer efficacement les CP, deux protocoles différents ont été envisagés. Ils font appel à une séparation basée sur la polarité, il s'agit de la SPE (Solid Phase Extraction ou, en français, séparation sur phase solide) et un protocole de purification liquide:liquide. Cette opération a été menée sur les algues provenant de différents sites le long d'un gradient latitudinal de la Norvège jusqu'au Portugal. Le poids moléculaire des composés phénoliques varie entre 126Da et 650KDa chez les Phaeophyceae (Targett et Arnold, 2001) mais les molécules plus couramment rencontrées ont une taille comprise entre 10K et 100KDa (Boettcher et Targett, 1993). Dans un deuxième temps, nous nous sommes donc intéressés à séparer les composés phénoliques contenus dans les extraits de *Sargassum muticum* en fonction de leur poids moléculaire et de leur taille. Ce travail a été réalisé par différentes techniques : respectivement par centrifugation, ultrafiltration, par dialyse et par nanofiltration. Une partie de cette étude a été effectuée dans le cadre du programme COSELMAR (stage de Master 2 de Hersant (2013)).

Un suivi de l'activité anti-ROS et antibactérienne a été mené au cours des différentes étapes de séparation. D'un point de vue général, les tests mesurant les activités antioxydantes / anti-radicalaires sur un extrait algal brut et/ou semi-purifié sont basés tant sur la détermination de produits résultant de l'oxydation que sur la mesure de l'efficacité d'une substance à piéger les radicaux libres (Huang *et al*., 2005). Dans notre étude nous avons utilisé différents tests dans le but de révéler différents types de mécanismes d'action des composés phénoliques extraits : le test anti-radicalaire du DPPH, le test du pouvoir réducteur du fer, le test d'activité anti-xanthine oxydase basé sur le piégeage de l'anion superoxide et le test du blanchiment du B-carotène. Ces tests incluent ceux basés sur une réaction de transfert d'électrons (DPPH et pouvoir réducteur) ainsi que ceux impliquant des réactions de transfert d'atomes d'hydrogène (test du β-Carotène), comme décrit par Huang *et al.* (2005). Le premier type de test mesure la capacité d'un anti-oxydant à réduire une substance oxydante avec un changement de couleur lorsque le composé est réduit alors que le deuxième type de test utilise une réaction de compétitivité entre un anti-oxydant et un substrat capable de générer des radicaux peroxyles grâce à la décomposition de composés azotés (Huang *et al*., 2005). Les tests du DPPH et du

pouvoir réducteur permettent de mesurer l'activité des composés lipophiles et hydrophiles alors que le test du blanchiment du β-carotène mesure l'activité des composés lipophiles seulement (Chew *et al*., 2008). L'activité xanthine oxydase mesure une autre capacité de récupération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) : l'anion superoxide ($O_2^{\cdot -}$) est généré par un système xanthine oxydase/hypoxanthine et réduit le NBT (nitroblue tetrazolium) en bleu de formazan si aucun compétiteur, dans notre cas une molécule active (échantillon à tester), n'est ajouté (Huang *et al*., 2005). Même si le $O_2^{\cdot -}$ n'est pas l'espèce réactive la plus dommageable pour les cellules, c'est un précurseur de ROS plus dangereux tels que l'oxygène singulet, le radical hydroxyle (HO●) et peroxynitrate(OONO-), par exemple ; et peut donc indirectement augmenter le risque d'oxydation (Huang *et al*., 2005).

Au cours des dernières années, de nombreux organismes marins économiquement importants en Europe ont été affectés par un nombre sans cesse croissant de pathologies. Une grande partie de ces maladies émergentes qui paralysent l'aquaculture européenne sont causées par des bactéries du genre *Vibrio* (Paillard *et al*., 2004). Nos extraits ont donc été testés sur trois bactéries marines du genre *Vibrio* responsables d'infections chez certains organismes aquatiques et d'intérêt aquacole : *V. eastuarianus* (pathogène pour l'huître creuse), *V. anguillarum* (pathogène pour certains poissons d'élevage) et *V. parahaemolyticus* (pathogène pour les animaux filtreurs et l'homme) (Tableau IV.13). Les extraits ont également été testés contre d'autres bactéries, terrestres cette fois, pour leur importance en santé humaine. Ces bactéries peuvent entrainer des symptômes graves voire la mort chez les individus infectés. Parmi les espèces pathogènes nous nous sommes intéressés à trois souches souvent responsables d'infections chez l'homme : *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

A travers cette approche, nous souhaitions pouvoir répondre à plusieurs questions :

- **les composés synthétisés par *S. muticum* sont-ils les mêmes d'un site à l'autre d'un même pays, et au sein des pays sélectionnés le long du gradient latitudinal ? S'agit-il du même type de composé synthétisé par l'espèce le long de son aire de répartition en Atlantique Nord-Est ?**

- **Les composés synthétisés possèdent-ils des activités anti-ROS et/ou anti bactériennes ?**

- **Au sein du pool de phlorotannins, est ce qu'il existe différentes classes de taille de composés ? Et si oui, comment se répartissent-ils dans ces différentes classes de taille ? De plus, est-ce que cette distribution en classes de taille des composés varie-t-elle le long du gradient latitudinal ?**

IV.3.2.Matériels et méthodes

IV.3.2.1. Echantillonnage

Les extractions se sont déroulées sur des individus de *Sargassum muticum* prélevés en trois sites de cinq pays (*cf.* Chapitre I pour la description des différents sites et Chapitre III pour la constitution de la poudre algale).

IV.3.2.2. Extraction des composés phénoliques

Au regard des résultats obtenus au chapitre II, les composés phénoliques ont été extraits par un mélange acétone :eau (50 :50). Dans un flacon à centrifuger 10 g de poudre d'algue sont extraits avec 200mL de solvant. L'extraction est réalisée à 40°C pendant 2h sous agitation magnétique et à l'obscurité. L'extrait obtenu est centrifugé à 2000g, 4°C pendant 10 minutes puis filtré sur coton de verre et évaporé sous vide par évaporation rotative à 40°C. Le volume d'extrait est ajusté à 50mL avec de l'eau distillée. L'extrait brut est conservé au congélateur à -25°C et à l'obscurité.

Cette extraction a été réalisée pour les 3 sites de chacun des pays étudiés, ce qui nous a permis d'obtenir 15 extraits bruts.

IV.3.2.3. Semi-purification des phlorotannins

Les deux techniques de purification utilisées sur les extraits bruts de *Sargassum muticum* font appel à une séparation par la polarité des phlorotannins. Après séparation, chacune des fractions est analysée soit par des tests colorimétriques (quantification de la teneur en CP et tests d'activités biologiques), soit par RMN du proton afin de s'assurer de la présence des CP dans les fractions actives.

IV.3.2.4. Purification sur colonne SPE (Solid Phase Extraction)

Ce protocole de purification est tiré de Zubia *et al.* (2009). Cinq mélanges de solvants sont passés successivement sur une colonne SPE (de l'anglais : Solid Phase Extraction) selon un gradient de polarité, allant du plus polaire (eau) au plus apolaire (dichlorométhane, noté DCM par la suite). Les colonnes SPE sont constituées de Silice C-18 capable de retenir les composés apolaires et de laisser passer les composés polaires (Figure IV.9). Il s'agit d'adsorber les composés à extraire sur une phase stationnaire contenue dans une cartouche puis de les récupérer lors de l'élution. Les lavages permettent d'éliminer les composés gênants tels que des composés très polaires (récupérés dans le premier lavage à l'eau) comme certains sucres ou certains composés très apolaires (qui ne seraient pas déjà retenus par la colonne) comme certains pigments, lipides, ect…

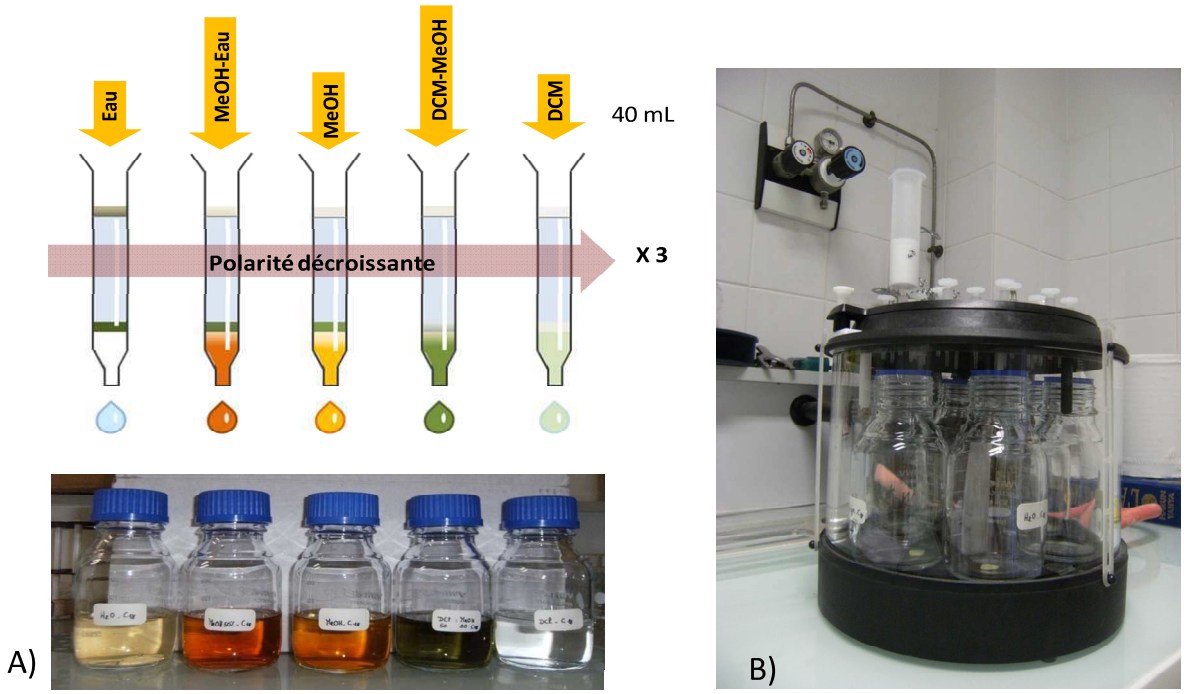


Figure IV.9. Système de purification par SPE : A) Principe d'élutions successives et B) système de récolte des fractions sous vide.

Les cartouches SPE (HF Bond Elut C18, 5mg, Varian) sont utilisées en combinaison avec un système sous vide (Vac Elut SPS 24, Varian), utilisé à une pression de 51 Kpa et permettant un flux de liquide constant dans les colonnes. Après conditionnement de la cartouche avec successivement, 20mL de MeOH puis d'eau distillée, 4mL d'extraits sont déposés et adsorbés sur celle-ci. Une élution par étape successives est ensuite effectuée ; 40mL de chacun des solvants suivants sont passés sur la colonne : eau distillée, méthanol 50% (v/v dans de l'eau distillée), méthanol 100%, mélange dichlorométhane :méthanol 50 :50 (v/v) et dichlorométhane 100%. Chaque extrait est purifié 4 fois afin d'accumuler des fractions en quantité suffisante : les fractions éluées identiques sont rassemblées et évaporées à l'aide d'un évaporateur rotatif (R-3000, Büchi, Flawil, Switzerland) à 40°C. Chacune des fractions est ensuite reprise dans le solvant approprié et lyophilisée avant analyse.

IV.3.2.5. Purification selon un procédé liquide-liquide

Ce protocole a été modifié d'après Jégou (2011). Il s'agit du même protocole modifié afin d'obtenir un extrait purifié en un minimum d'étapes. La figure résume les différentes étapes de purification de l'extrait brut. La figure IV.10 résume les différentes étapes de purification de l'extrait brut.

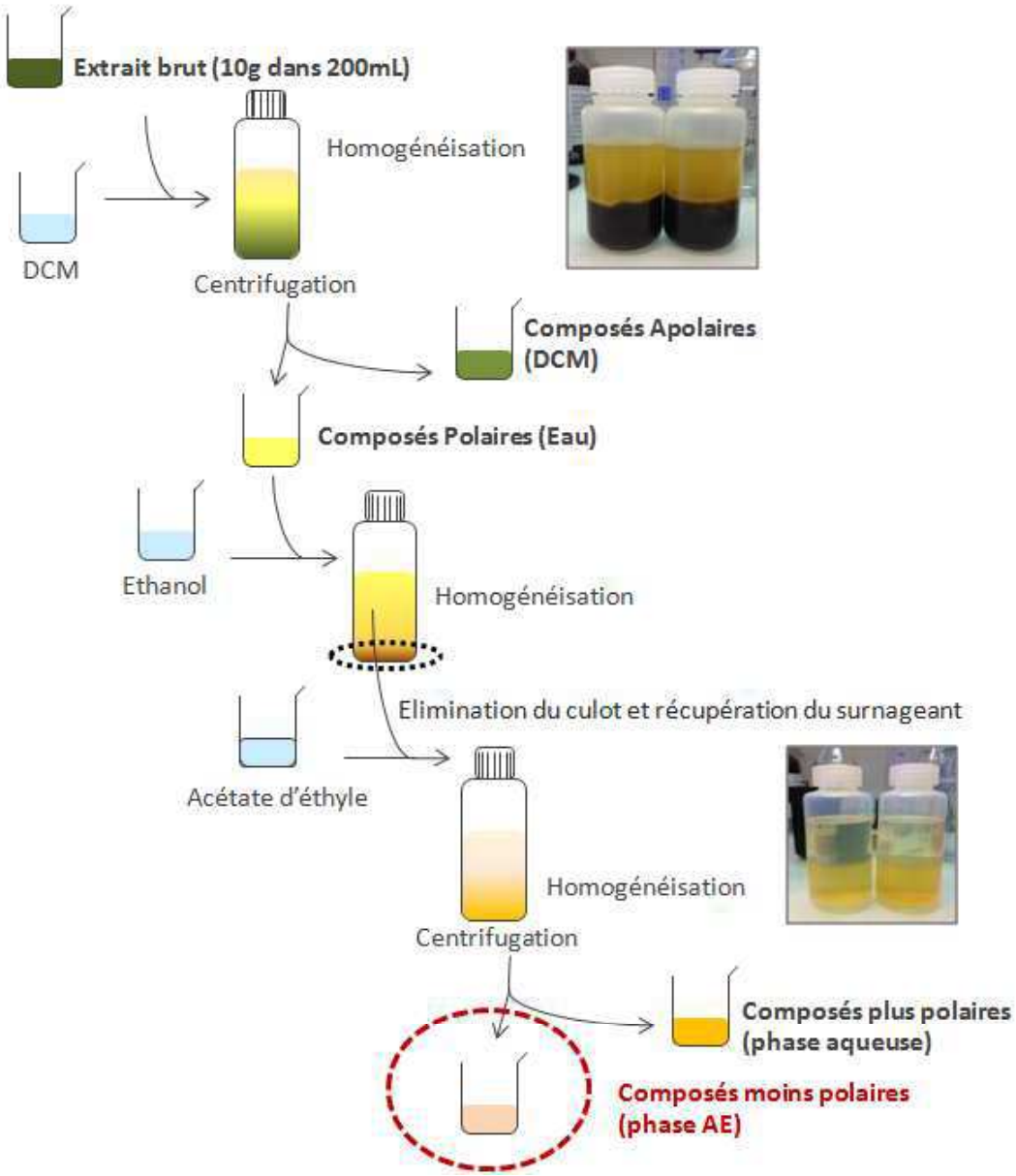


Figure IV.10. Synoptique du protocole de purification des composés phénoliques selon un procédé liquide : liquide.

Tout d'abord, une extraction liquide/liquide au DCM est réalisée avec 50mL de ce solvant et les 50mL de l'extrait brut, le tout est homogénéisé, centrifugé à 2000 tours/min pendant 10 min. La phase DCM apolaire est éliminée. Ensuite, l'extrait subit une précipitation à l'éthanol en ajoutant 150mL d'éthanol sur l'extrait de 50mL, mis au congélateur 1h à -25°C, centrifugé à 2000 tours/min pendant 10 min, le surnageant est récupéré et l'éthanol est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Enfin, l'extrait est mélangé avec de l'Acétate d'éthyle (AE) : 50 mL d'AE sont ajoutés aux 50mL de l'extrait. Deux phases sont ainsi récupérées : une phase aqueuse et une phase AE où sont solubilisés les phlorotannins. Les teneurs de composés phénoliques de l'extrait brut, de la phase aqueuse et de la phase AE sont déterminées. Ces deux mêmes phases sont également analysées par RMN du proton.

IV.3.2.6. Séparation des composés phénoliques par classes de taille et comparaison de différentes techniques de séparation

Les différentes techniques testées dans ce travail de thèse sont basées sur la concentration des molécules et leur séparation selon la taille. Chaque procédé permet de séparer l'échantillon de départ en un perméat (passant au travers de la membrane) et un rétentat (retenu sur la membrane).

Quel que soit le procédé de séparation utilisé, les teneurs initiales en CP des extraits brut ou purifié sont notées, puis après chacune des séparations la teneur et les activités des rétentats et perméats (Figure IV.11) sont mesurées afin de bien suivre la progression des CP et leur séparation. Il s'agit ici de raisonner en masse de composés retenus ou non par rapport à la masse de composé présente dans l'extrait de départ. En effet, nombres d'analyses du même type sont réalisées en aveugle et ne tiennent compte que de la teneur en CP dans le concentrat (en % du PS du concentrat) sans tenir compte des possibles pertes de matière lors de la manipulation, les quantités de composés présents dans le filtrat sont donc souvent surestimées.

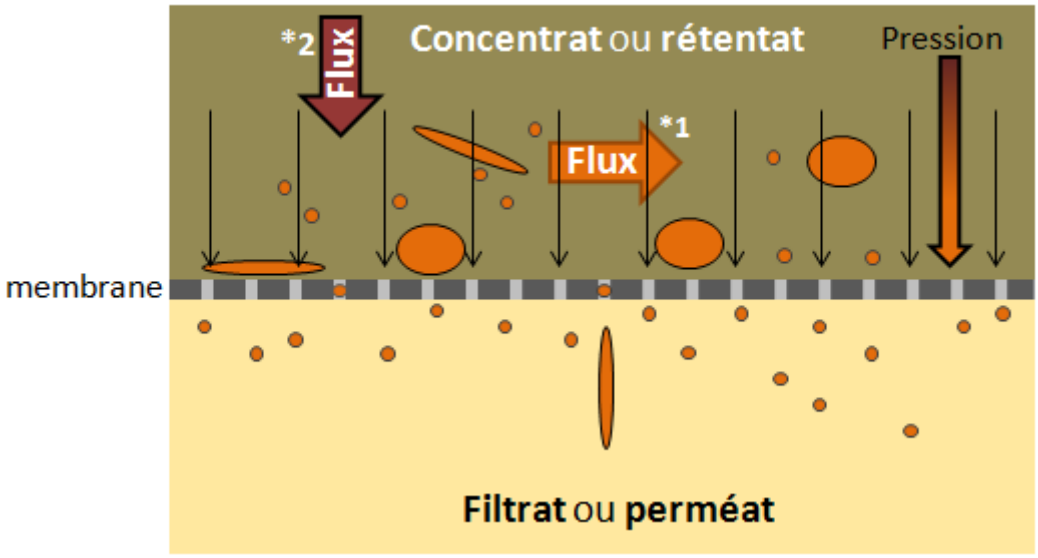


Figure IV. 11. Représentation schématique d'un procédé de filtration membranaire. Deux types de flux peuvent être rencontrés suivant le procédé utilisé : *1 flux tangentiel : pour les procédés d'ultrafiltration, de nanofiltration et de dialyse et *2 flux frontal (perpendiculaire à la membrane) pour le procédé de centrifugation.

a) Séparation par ultrafiltration

La filtration membranaire est de plus en plus utilisée comme procédé de séparation pour des applications variées à l'échelle du laboratoire et industrielles. Elle est basée sur l'application d'une différence de pression qui permet le transfert du solvant à travers une membrane dont la taille des pores assure la rétention de solutés. Entre le passage de deux extraits un nettoyage de la membrane est effectué avec une solution de NaOH à 0.1N et un

rinçage à l'eau distillée qui permet de vérifier le débit de sortie (il faut qu'il soit proche de celui de départ, lorsque la cassette est neuve). Le système d'ultrafiltration utilisé est un petit système miniaturisé de paillasse (système Minimate™ TFF System de chez Pall Life Sciences©). Celui-ci fonctionne avec une pompe péristaltique à variation de vitesse permettant de délivrer un flux constant à la surface de la membrane avec une pression de 2 bars. Le réservoir d'alimentation peut contenir jusqu'à 500mL de solution (Figure IV.12). On peut ensuite tout au long de la manipulation récupérer le filtrat et/ou le concentrat (grâce au système de vannes) pour analyser le contenu des suspensions à tout moment.

Figure IV. 12. Système d'ultrafiltration (PMinimate TFF-Pall©)

Les capsules d'ultrafiltration utilisées (Minimate TFF) contiennent une membrane d'ultrafiltration (polyéthersulfone) scellée dans le dispositif et disponible dans une large gamme de poids moléculaire. Nous avons utilisé les membranes de 10KDa et de 1KDa pour cette étude en se basant sur les résultats de Le Lann *et al.* (2012a,b). Pour chacun des extraits (repris dans de l'eau distillée), 50mL d'extrait dilués dans 200mL d'eau distillée sont mis en circulation pendant plusieurs heures (en fonction des flux de perméat dépendant du seuil de coupure) ; le filtrat et le rétentat sont récupérés, concentrés par centrifugation et analysés.

b) Séparation par Nanofiltration

Ces essais, menés dans le cadre du projet Coselmar, ont été réalisés sur un pilote semi-industriel de la plateforme technologique du GEPEA de St Nazaire.

La membrane utilisée est une AFC 80 (Microlab 40) (Figure IV.13). C'est une membrane tubulaire en polyamide, avec une surface de 0.033 m² et un diamètre de pore de 0.68 nm. La perméabilité de la membrane utilisée est d'environ 2.9 L/h/m²/bar. Le conditionnement de la membrane se fait par des lavages successifs d'eau distillée, de NaOH

(0.25%) pendant 30 min puis d'eau distillée, d'HNO_3 (0.3%) pendant 15 min et enfin un rinçage à l'eau distillée. Les échantillons sont passés sur la membrane à 40 bars et 20°C. Le seuil de coupure est très inférieur à celui des autres techniques ; le but étant ici de tester la faisabilité d'une concentration directe des extraits ; ce qui semblait particulièrement délicat pour les extraits bruts, relativement visqueux, et susceptibles de colmater les membranes assez rapidement. Pour cette raison, nous avons dilué les extraits : 50mL d'extraits sont dilués dans 2L d'eau distillée et passés sur la membrane. Le filtrat et le rétentat sont ensuite concentrés par centrifugation puis analysés.

Figure IV.13. Système de nano-filtration (pilote semi-industriel, GEPEA, St-Nazaire).

c) Séparation par centrifugation

Des membranes de cellulose régénérée modifiée de marque Hydrosart® avec une surface de membrane active de 3,9 cm² et de seuil de coupure 5K, 10K et 30KDa ont été utilisées (Figure IV.14). Pour cela, 10mL de l'extrait sont placés sur la partie supérieure du tube puis centrifugés à 3 000g, à 15°C pendant le temps nécessaire à faire passer l'extrait au travers de la membrane (entre 1h et 3h). Nous avons adopté un procédé en cascade consistant à déposer les extraits sur une membrane puis à récupérer le perméat pour le filtrer sur une membrane de seuil de coupure (SC) inférieur.

Le rétentat ainsi que le filtrat sont récupérés pour réaliser les dosages des teneurs en composés phénoliques, ainsi que les activités anti-radicalaires et antioxydantes, ainsi qu'une analyse en RMN du proton.

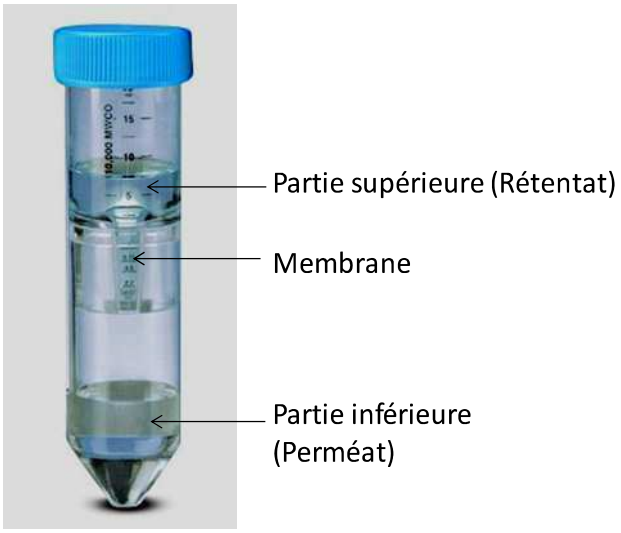


Figure IV.14. Tubes à membrane de cellulose utilisés pour la séparation par centrifugation (Hydrosart ©).

d) Séparation par dialyse

Une des méthodes simples de semi-purification des composés phénoliques est la dialyse (Connan, 2004). Des membranes de cellulose ester à seuil de coupure 500-1KDa, 6K-8KDa et 12K-14KDa ont été utilisées. Le principe de cette méthode consiste à plonger les boudins de dialyse préalablement remplis à moitié (5mL) avec de l'extrait dans un grand volume d'eau distillée (500mL) renouvelée régulièrement (à 2h, à 8h, à 22h) (Figure IV.15). Les molécules inférieures au seuil de coupure (500-1K, 6-8K ou 12-14KDa) passent au travers de la membrane par diffusion et les plus grandes restent donc dans le boudin de dialyse. Afin d'obtenir différentes fractions de taille en composés phénoliques, chaque extrait est passé sur différentes membranes de dialyse.

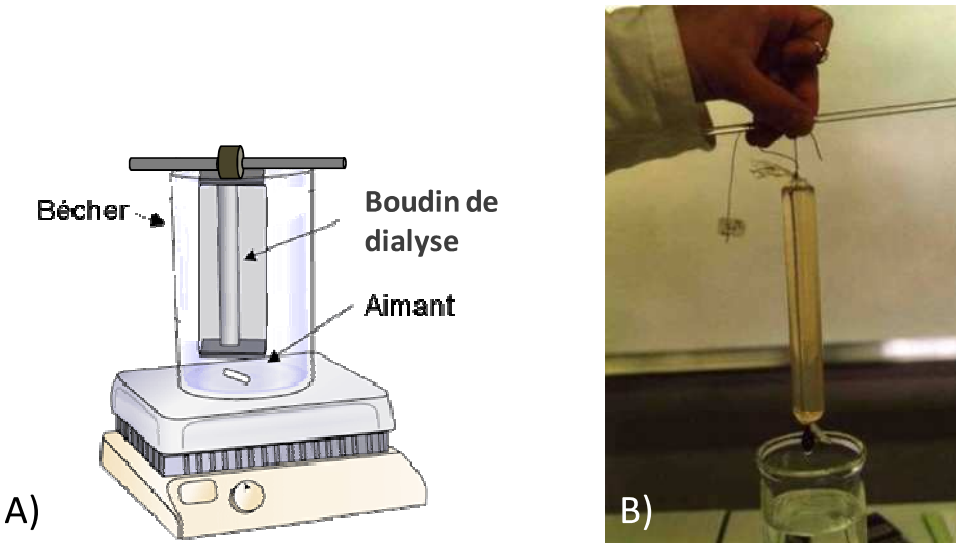


Figure IV.15. Séparation par dialyse. A) Système de dialyse en circuit fermé (modifié d'après [6][9]) et B) Détail d'un boudin de dialyse.

[9] Référence électronique indexée en fin de manuscrit

La dialyse est effectuée en circuit fermé, dans de l'eau distillée sous agitation magnétique, à l'obscurité. Elle dure environ 28 heures avec un renouvellement d'eau distillée trois fois. Le concentrat contenu dans le boudin est conservé pour le dosage des teneurs en composés phénoliques ainsi que le filtrat (il sera concentré par évaporation rotative à 40°C et ajusté à 50mL).

IV.3.2.7. Comparaison de méthodes de séparation par taille

Avant d'étudier l'efficacité de chaque procédé sur la concentration des composés phénoliques, il est intéressant de comparer les différentes capacités en termes de volume passé, temps et coût pour chacun des procédés, ainsi que les teneurs totales en phlorotannins (TTP) et les activités anti-radicalaires. Pour chaque facteur, un système de point a été créé afin d'attribuer un score à chaque technique (à noter que le score le plus bas est le plus efficace). Pour chaque facteur les points ont été attribués de 1 à 3 : « 1 » étant le cas le moins avantageux et « 3 » le cas le plus intéressant.

- Pour le volume de suspension traitable en une fois : 1 correspond à des volumes supérieurs à 1L, 2 correspond à des volumes compris entre 100mL et 1L et 3 pour les volumes inférieurs à 100mL.

- Pour la durée du procédé nécessaire au passage d'un échantillon : 1 correspond à moins de 2h, 2 entre 2 et 5h et 3 pour des durées supérieures à 5h.

- Le coût des membranes a été apprécié à : 1 pour les membranes de moins de 20€, 2 pour les membranes entre 20 et 500€ et le 3 correspond aux systèmes avec un coût supérieur à 500€.

- Enfin, les scores attribués en fonction de la TTP sont : 3 pour les échantillons ayant une TTP de 1 à 5%MS de la fraction, 2 pour les échantillons ayant une TTP comprise entre 5 et 20%MS de la fraction et 1 pour les TTP supérieurs à 20%MS de la fraction.

NB : Attention, toutefois ces scores ne sont qu'arbitraires puisqu'ils ne tiennent pas compte du coût du « gros » matériel de laboratoire tel que le pilote pour le procédé d'ultrafiltration et le système de nanofiltration. Cependant, en cas d'utilisation fréquente, malgré le coût important de ces deux pilotes celui-ci peut être rapidement amorti.

IV.3.2.8. Tests d'appréciation de l'activité biologique

a) Activités anti-ROS

Différentes techniques pour évaluer les activités biologiques peuvent être utilisées pour mesurer les activités anti-ROS des extraits obtenus : l'évaluation antiradicalaire utilisant le DPPH, la méthode du blanchiment du β-carotène (*cf.* Chapitre I). Pour les extraits bruts, le test Xanthine Oxydase/NBT et la mesure du pouvoir réducteur du Fer ont été effectués.

a.1) Activité anti-xanthine oxydase

Le test, basé sur le piégeage de l'anion superoxide, a été effectué suivant la méthode de Nagai *et al.* (2003) ; il est décrit en figure IV.16. Le test d'activité utilisant la xanthine oxydase mesure la capacité récupératrice d'un certain type d'espèce réactive de l'oxygène : l'anion superoxide ($O_2^{\cdot -}$), qui est généré par le système xanthine oxydase/hypoxanthine et qui réduit le colorant nitroblue tetrazolium (NBT) pour former le bleu de formazan en absence de compétiteur, c'est-à-dire en absence d'une substance antioxydante (l'échantillon dans notre cas) (Huang *et al.*, 2005). Le mélange réactionnel déposé sur microplaque est constitué de 203 µL de tampon Tris HCl (pH 7.5) 0.05M, 57 µL d'hypoxanthine à 5 mM, 30 µL de NBT à 0.33 mM NBT et 13 µL d'échantillon. Après incubation durant 10 min à 25°C, la réaction est arrêtée par l'ajout de 30 µL de xanthine oxydase et les plaques sont laissées à température ambiante durant 21 min pendant lesquelles l'absorbance est mesurée toutes les 3 min à 560 nm. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante (Chua *et al.*, 2008) :

$$\% \text{ inhibition} = [(DO_{témoin} - DO_{échantillon})/DO_{témoin}] \times 100$$

Les résultats sont exprimés sous la forme de l'indice IC_{50} ($mg.mL^{-1}$) qui correspond à la concentration de substrat nécessaire pour causer 50% d'inhibition.

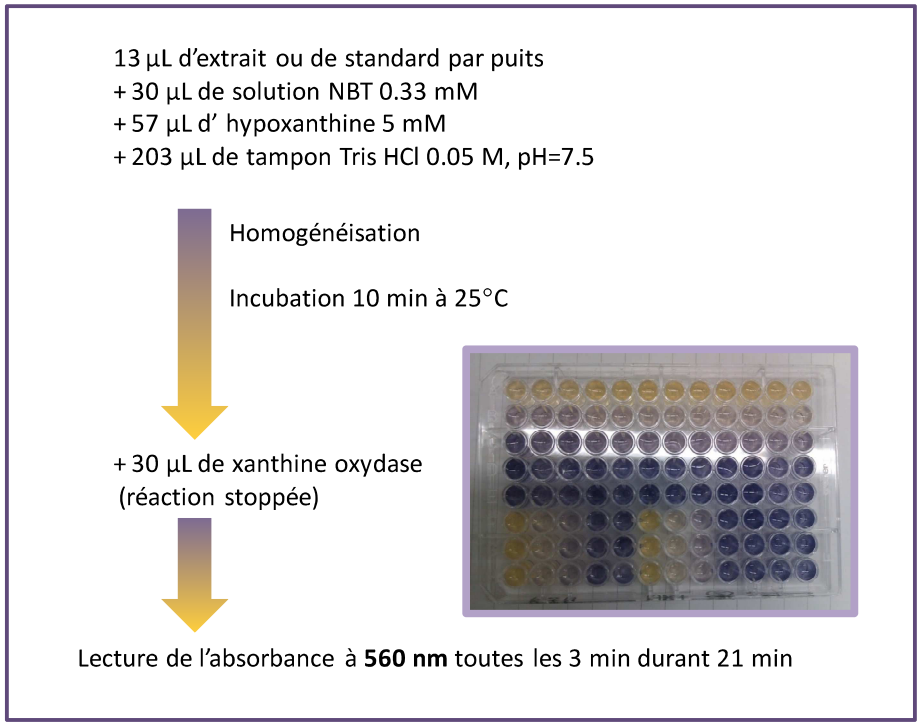


Figure IV.16. Protocole détaillé du test XO/NBT, test colorimétrique *in vitro* en microplaques.

a.2) Pouvoir réducteur du Fer

Le dosage du pouvoir réducteur permet d'évaluer la capacité antioxydante d'extraits. Le pouvoir réducteur du fer, comme le test DPPH, permet de mesurer indifféremment l'activité des composés lipophiles et hydrophiles (Chew *et al.*, 2008).Ce test a été adapté à partir de la méthode de référence d'Oyaizu (1986) et son protocole est résumé en figure IV.17. Il repose sur la réduction à chaud d'ions Fe^{3+} (apportés par une solution de potassium ferricyanide) en ions Fe^{2+}. Cette réduction a lieu en présence de molécules réductrices présentes dans l'extrait testé. L'ajout de $FeCl_3$ va révéler la formation des ions Fe^{2+} par réaction des ions chlorure avec les ions Fe^{2+} pour former du $FeCl_2$ de couleur bleu-vert. Cette capacité réductrice d'un extrait est quantifiée par spectrophotométrie. Les résultats sont exprimés sous forme d'EC_{50} en $mg.mL^{-1}$ correspondant à la concentration effective d'extrait nécessaire pour obtenir une DO (densité optique) égale à 0,5. Cette valeur a été obtenue par interpolation d'une courbe de régression linéaire. L'EC_{50} des échantillons est comparée à celui de molécules de référence citées précédemment (*cf.* Chapitre I).

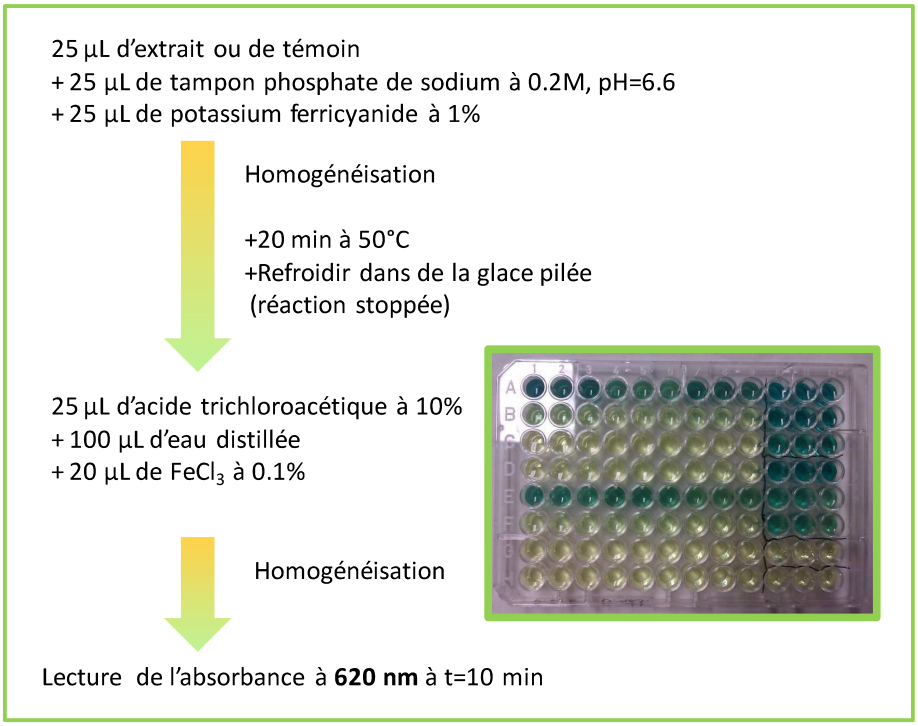


Figure IV.17. Protocole détaillé du test du pouvoir réducteur du fer, test colorimétrique *in vitro* en microplaques.

b) Activités antibactériennes

Les extraits bruts et semi-purifiés à cinq concentrations de 50 à 150 $\mu g.mL^{-1}$ ont été testés pour leur activité inhibitrice de la croissance de six souches bactériennes :

- Trois souches marines provenant de la collection d'Ifremer : *Vibrio aestuarianus* (S02-041), *Vibrio anguillarum* (S11-054) et *Vibrio parahaemolyticus* (S12-011) ;

- et trois souches terrestres : *Escherichia coli* (T05-006, ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (T05-007, ATCC 65388) et *Pseudomonas aeruginosa* (T05-005, ATCC 15442) (Figure IV.18).

Chaque traitement et contrôle sont analysés en réplicat (n=4). Les extraits sont incubés durant 24h en présence de bactéries en phase exponentielle de croissance (à environ 2.10^8 UFC/mL) sur des microplaques 96 puits (VWR) dans du milieu LB (Luria Hinton Broth, Sigma, Andover, UK) enrichie en sel (35 $g.L^{-1}$) pour les souches marines, à 21 ou 37°C pour les souches marines et terrestres respectivement selon leur température optimale de croissance. L'antibiotique Chloramphenicol (à large spectre d'action car non spécifique d'une souche en particulier) est utilisé comme contrôle à la même concentration que les extraits testés. Seuls les résultats de la plus petite concentration testée sont présentés dans ce chapitre.

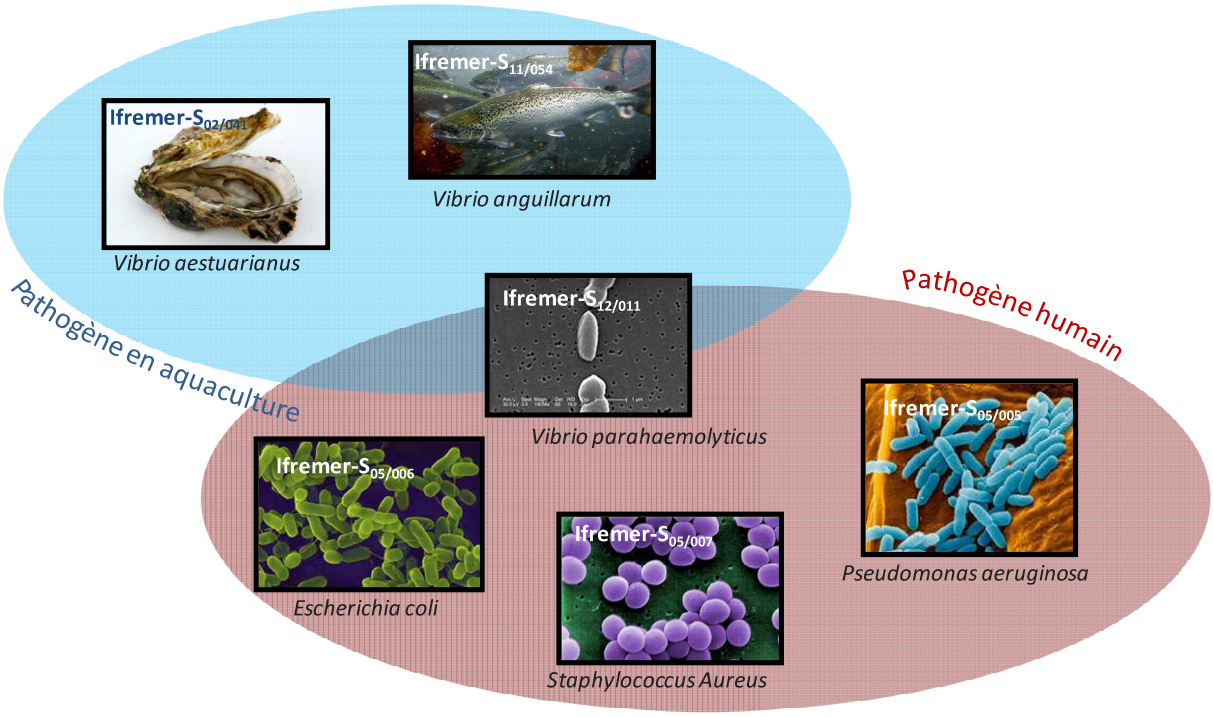


Figure IV.18. Souches bactériennes utilisées pour les tests antibactériens (provenance : Souchothèque Ifremer). Les images présentées pour illustrer les pathogènes en aquaculture illustrent les hôtes habituellement infectés par ces deux espèces de *Vibrio*.

NB : Une petite expérience a également été menée afin de détecter par la présence de deux espèces de *Vibrio* : *V. tapetis* et *V. harveyi* à la surface des thalles de *Sargassum muticum*. L'ADN total de l'algue a été extrait et les fragments caractéristiques de ces souches bactérienne ont été amplifiés génétiquement. Cette expérience n'a été faite que sur les algues provenant de France (algues récoltées sur le site du Dellec en Juillet 2011, *cf.* Chapitre I). Les résultats obtenus sont présentés en Annexe n°4.

IV.3.3.Résultats

IV.3.3.1. Variabilité de la teneur en CP chez *Sargassum muticum* prélevée le long du gradient latitudinal

Les résultats ainsi que la discussion inhérents à cette étude sur la variabilité des composés phénoliques contenus dans les échantillons provenant de cinq Pays le long des côtes atlantiques, ont fait l'objet d'une publication dans la revue «*Journal of applied Phycology*» sous la référence suivante :

"Assessment of the spatial variability of phenolic contents and associated bioactivities in the invasive *Sargassum muticum* sampled along its European range from Norway to Portugal"

Tanniou Anaëlle, Vandanjon Laurent, Incera Monica, Serrano Leon Esteban, Husa Vivianne, Le Grand Jacqueline, Nicolas Jean-Louis, Poupart Nathalie, Kervarec Nelly, Engelen Ashwin, Walsh Richard, Guerard Fabienne, Bourgougnon Nathalie, Stiger-Pouvreau Valérie.

DOI 10.1007/s10811-013-0198-x

Sargassum muticum est une algue brune actuellement présente le long des côtes atlantiques, du Sud de la Norvège au sud du Portugal. Comme cette espèce est présente en grande quantité au printemps et en été en Europe nous nous sommes intéressés à la possibilité de la valoriser. Sa position géographique et les conditions environnementales peuvent jouer sur la quantité et la qualité des composés de défense qu'elle va pouvoir produire. Afin de montrer les variations spatiales du contenu en phlorotannins le long d'un gradient latitudinal européen, *Sargassum muticum* a été récoltée dans trois sites des cinq pays étudiés afin de trouver de potentielles applications à cette espèce invasive, avec un intérêt particulier pour les CP et leurs activités potentielles. En effet, les composés phénoliques dosés en grande quantité chez les Phaeophyceae sont des métabolites secondaires synthétisés en réponse au stress et possédant des activités biologiques intéressantes. Dans ce contexte, les extraits bruts obtenus grâce à un mélange Acétone-Eau ont été semi-purifiés en utilisant des colonnes SPE (*cf.* paragraphe IV.3.2.4). Des tests sont effectués afin de mesurer les activités anti-oxydantes et anti-microbiennes des extraits bruts et semi-purifiés. La teneur en composés phénoliques est mesurée par le test colorimétrique de Folin-Ciocalteu, les activités anti-ROS sont mesurées grâce à différents tests tels que le DPPH, pouvoir réducteur, la méthode du blanchiment du β-carotène et le test de la XO/NBT. Les activités anti-bactériennes sont testées sur des souches marines et terrestres pour leur intérêt dans les domaines de l'aquaculture ou de la médecine. Notre technique de purification par SPE a permis d'isoler et de purifier des phlorotannins actifs qui ont ensuite été identifiés par RMN. Les résultats mettent en avant des différences entre les contenus phénoliques des différents pays et entre les sites au sein d'un même pays bien que la qualité des composés produits ne change pas ou très peu entre les pays. Ainsi, ce sont des composés de type phlorethols qui sont produits par *S. muticum* dans les différents pays colonisés. De plus, les fractions obtenues, en particulier aux extrémités du gradient, présentent des activités très importantes. *Sargassum muticum* représente donc une source de substances bioactives naturelle et sa récolte pourrait représenter une possibilité intéressante de gestion de cette espèce invasive en Europe.

J Appl Phycol
DOI 10.1007/s10811-013-0198-x

Assessment of the spatial variability of phenolic contents and associated bioactivities in the invasive alga *Sargassum muticum* sampled along its European range from Norway to Portugal

A. Tanniou · L. Vandanjon · M. Incera · E. Serrano Leon · V. Husa · J. Le Grand · J.-L. Nicolas · N. Poupart · N. Kervarec · A. Engelen · R. Walsh · F. Guerard · N. Bourgougnon · V. Stiger-Pouvreau

Received: 9 June 2013 / Revised and accepted: 29 October 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract *Sargassum muticum*, an invasive brown macroalga presently distributed along European Atlantic coasts from southern Portugal to the south coast of Norway, was studied on a large geographical scale for its production of phenolic compounds with potential industrial applications and their chemical and biological activities. *S. muticum* can produce high biomass in Europe, which could be exploited to supply such compounds. *S. muticum* was collected in Portugal, Spain, France, Ireland and Norway (three sites/country) to examine the effect of the latitudinal cline and related environmental factors. Assays focused particularly on polyphenols and their activities. Crude acetone–water extracts were purified using solid phase extraction (SPE) and antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts and semi-purified fractions measured. Total phenolic content was assessed by colorimetric Folin–Ciocalteu assay and reactive oxygen species activities by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, reducing power, β-carotene bleaching method and xanthine oxidase assay. Antibacterial activities were tested on terrestrial and marine strains to evaluate potential use in biomedical and aquaculture fields. Purified active phlorotannins, isolated by SPE, were identified using NMR. Phenolic contents differ clearly among countries and among sites within countries. Quality did not change between countries, however, although there were some slight differences in phlorethol type. Additionally, some fractions, especially from the extreme north and south, were very active. We discuss this in relation to environmental conditions and the interest of these compounds. *S.*

A. Tanniou (✉) · E. Serrano Leon · N. Poupart · F. Guerard · V. Stiger-Pouvreau
LEMAR (UMR 6539 CNRS UBO IRD Ifremer)–Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM)Université de Bretagne Occidentale (UBO), Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France
e-mail: anaelle.tanniou@univ-brest.fr

L. Vandanjon
Laboratoire GEPEA, CRTT, GEPEA (UMR CNRS 6144)-Université de Nantes, 44602 Saint-Nazaire, France

L. Vandanjon
Université de Bretagne-Sud, 56321 Lorient, France

M. Incera
CETMAR, 36208 Bouzas-Vigo, Spain

V. Husa
Institute of Marine Research, 5817 Bergen, Norway

J. Le Grand · J.-L. Nicolas
LEMAR (UMR 6539 CNRS UBO Ifremer IRD)-Ifremer, Centre de Brest, 29280 Plouzané, France

N. Kervarec
Service RMN-RPE, UFR Sciences et techniques, Université de Bretagne Occidentale (UBO), Avenue Le Gorgeu, 29200 Brest, France

A. Engelen
CCMAR-University of Algarve, Faro, Portugal

R. Walsh
Irish Seaweed Research Group, Ryan Institute, National University of Ireland, Galway, Ireland

N. Bourgougnon
Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA3884, IUEM, Université de Bretagne-Sud (UBS), 56000 Vannes, France

Published online: 26 November 2013

muticum represents a potential natural source of bioactive compounds and its collection could offer an interesting opportunity for the future management of this species in Europe.

Keywords Antioxidant activities · Antibacterial activities · Latitudinal gradient · Phenolic compounds · Solid phase extraction · *Sargassum muticum*

Introduction

Seaweeds are used in many countries as a source of food and molecules, with many industrial applications, mostly involving phycocolloid extraction and, to a lesser extent, isolation of certain biomolecules with pharmaceutical, medicinal and other industrial uses (Bourgougnon and Stiger-Pouvreau 2011). In the last few years, natural antioxidants from plant and animal sources have been actively investigated as replacements for synthetic antioxidants currently used as food additives. This recent interest in natural antioxidants as food additives has increased partly because of the restriction in synthetic antioxidant utilization in the food industry due to their long-term toxicological effects, including carcinogenicity (Ito et al. 1986; Aruoma et al. 1997; Bandoniené et al. 2000). Brown algal species are known to naturally produce antioxidant compounds in great quantities: up to 20 % DW in Fucales (Ragan and Glombitza 1986; Targett et al. 1995). Indeed, in coastal ecosystems, biotic and abiotic factors are known to affect algae species. To defend themselves against these stresses, seaweeds are known to produce a great variety of defensive metabolites. Consequently, they can be a very interesting source of new substances for industry. Among such defensive substances, phenolic compounds (PC), also known as phlorotannins, are secondary metabolites synthesized during development as components of algal cell walls (Schoenwaelder and Clayton 1998) or as a chemical defence in response to abiotic or biotic stress conditions, such as UV radiation, grazing, bacterial infection or epiphytism, as well as for intra- and interspecific communication (Ragan and Glombitza 1986; Connan et al. 2004; Stiger et al. 2004; Koivikko et al. 2005; Plouguerné et al. 2006; Bourgougnon and Stiger-Pouvreau 2011). As these compounds are produced in response to the production of reactive oxygen species (ROS), PC exhibit anti-ROS, i.e. antioxidant, properties (Nakai et al. 2006; Kuda et al. 2007; Kumar Chandini et al. 2008). Structurally, phlorotannins are oligomers and polymers of 1,3,5-trihydroxybenzene (phloroglucinol) (Ragan and Glombitza 1986; Targett and Arnold 2001; Koivikko et al. 2007) and can be considered as a pool of PC with different natures and/or polarity. Within a species, phenolic compounds can also vary greatly both spatially (Steinberg 1986, 1989, 1992; Van Alstyne and Paul 1990; Targett et al. 1992, 1995; Steinberg et al. 1995; Pavia and Aberg 1996; Van Alstyne et al. 1999; Stiger et al. 2004; Le Lann et al. 2012a) and temporally (Stiger et al. 2004; Connan et al. 2004; 2007; Plouguerné et al. 2006). However, few studies have examined this spatial variation in connection with the activities displayed by these compounds though large-scale sampling of a single species.

In Brittany, native marine algae species are already harvested for industrial applications (agri-food, cosmetics and thalassotherapy). In some places, native species are in competition with introduced species that have proliferated. Invasive seaweeds are often very promising for industrial applications as the chemical defences they have developed that allow them to overcome geographical barriers and colonize new environments, making them a source of interesting active molecules. In this context, *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, which is an invasive species in Europe living on rocky shores, was chosen as a model organism to find applications for its phlorotannin pool. This brown macroalga, native to Japan, has spread widely along the European Atlantic coasts since its introduction on the Atlantic coast (Plouguerné et al. 2006; Kraan 2008; Engelen et al. 2008; Incera et al. 2009; Olabarria et al. 2009; Le Lann et al. 2012b); it is currently one of the most readily available Sargassaceae species on European shores. Its large sustainable biomass could represent a viable biotechnological asset in European resource development programs as it is known to produce phlorotannins of interest (Tanniou et al. 2013).

The aim of this work was therefore to study the chemical plasticity, i.e. the spatial variability, of *Sargassum* phenolic compounds in Europe and to see how the quantity and quality of the compounds vary according to country and, finally, to see how *S. muticum* can be usefully exploited in Europe. We assessed the antioxidant and antibacterial activities of extracts obtained from specimens established in five countries along a latitudinal gradient: Norway, Ireland, France, Spain and Portugal, from north to south of the North-East Atlantic coast. Antioxidant activities of extracts were characterized by four biochemical methods (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, reducing activity, xanthine oxidase inhibition and β-carotene–linoleic acid system), and their total phenolic contents were quantified. This led us to further select some crude extracts for fractionation by a solid phase extraction (SPE) device in order to determine the antioxidant activity and total phenolic content of each fraction. Antibacterial assays were also conducted with six bacterial strains, three marine and three terrestrial, to determine the antibacterial activities of the crude and purified extracts. Proton nuclear magnetic resonance (^{1}H NMR) analysis was carried out on active fractions to determine compounds responsible for the activities detected.

Materials and methods

Sampling: algal material and abiotic parameters

Thalli of *S. muticum* were collected between March and May 2011 in three sites in each of five countries along a latitudinal gradient in Europe. Samples were collected, from South (March) to North (May), in Portugal, Spain, France, Ireland and, finally, Norway (Fig. 1). The sampling time was chosen according to the physiological state of the algae in each country. In these periods, *S. muticum* was still immature in all sites. The sampled countries were also chosen according to the chronology of expansion of *S. muticum* along Atlantic coasts; of the countries our sampling, France was the first colonized and Ireland was the most recently colonized.

Collection was at low tide on semi-exposed or exposed sites in all countries except Norway, where one site was qualified as "sheltered". The hydrodynamic conditions of the sites were determined according to their topography and the flora present during sampling. Other environmental parameters, such as seawater temperature, photosynthetically available radiation and water salinity, were determined from measurements made by satellites as part of the AQUA Modis and Aquarius missions of National Aeronautic and Space Administration (NASA). These data are presented as data ranges for the sampling periods considered (Table 1) according to country (see Tanniou et al. 2013, in review).

During collection, only the apical and median parts of the thalli were taken and the holdfast was left in place to allow regrowth and thus minimize collection impact. Immediately after collection and epiphyte removal, the seaweeds were washed first with filtered seawater then distilled water in order to remove residual sediments and salts. The cleaned algal materials were then surface dried with blotting paper towel, chopped into fragments, pooled by site, freeze-dried, reduced to powder with a Waring Blender and, finally, sieved at 250 μm.

Solid/liquid extraction of phenolic compounds

Two grams dry weight (DW) of finely ground algal material was placed in 250 mL flasks and extracted using 150 mL of an acetone–water mixture (50:50 *v*/*v* in distilled water). Each preparation was left under stirring at 40 °C for 3 h in the dark. The mixtures were then centrifuged using an Eppendorf 5810 R centrifuge (Eppendorf A.G., Germany) at 4,000×*g* for 10 min at 4 °C. The supernatants were then filtered on cotton wool and concentrated to dryness under reduced pressure at 40 °C using a rotary evaporator (R-3000, Büchi, Switzerland). About 10 mL Milli-Q water were then added to each residue

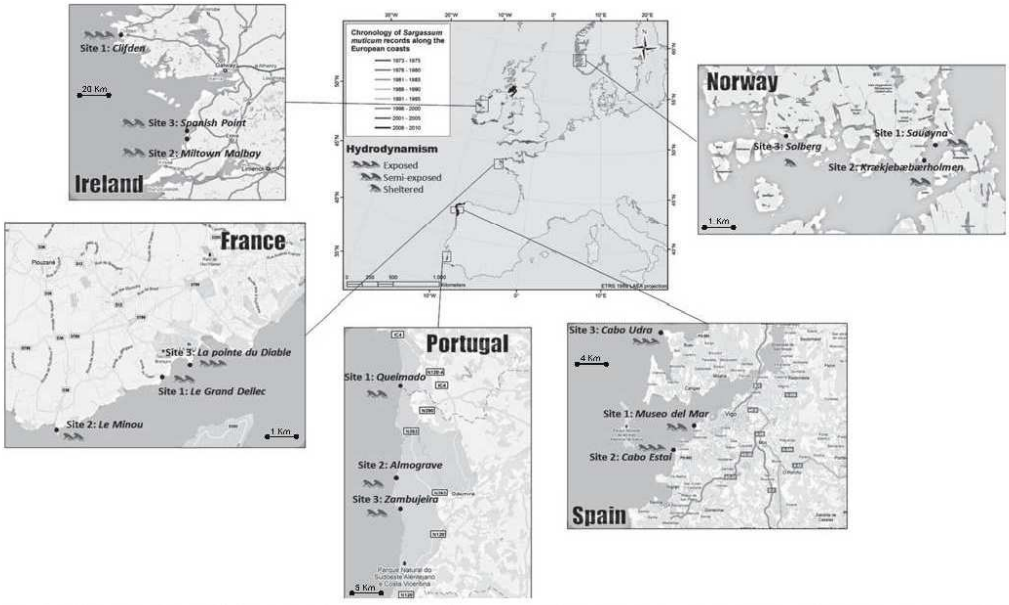


Fig. 1 Sampling sites along the Atlantic coasts of Europe where *S. muticum* were collected to examine variations in phenolic concentrations and activities over a large scale (three sites per country: Norway, Ireland, France, Spain and Portugal)

Table 1 Environmental parameters according to country during the sampling period (March to May 2011; see Tanniou et al. 2013 in review): sea surface temperature, photosynthetically available radiation and sea surface salinity. Data obtained from NASA satellites during the two missions Aqua MODIS and Aquarius

Abiotic parameters	Norway	Ireland	France	Spain	Portugal
Sea surface temperature in °C	*8–10*	12–14	12–14	12–14	**18–20**
Photosynthetically available radiation in mol photons m^{-2} day^{-1}	35–40	*30–35*	35–40	*20–25*	**40–45**
Sea surface salinity PSU	*34*	35	35	36	**37**

Details presented in italics correspond to low values, in normal to average values and bold to high values

to give the crude extract. All extracts were then freeze-dried prior to further analyses (phenolic content quantification and NMR analyses), apart from 4 mL that was used directly for the purification. All the extracts were prepared in triplicate: three extractions were made per site and then pooled for further analyses.

Purification of crude extracts

Crude extracts were purified by SPE following a modified protocol published by Zubia et al. (2009). The SPE cartridges (HF Bond Elut C18, 5 mg, Varian) were used in combination with an under partial vacuum system (Vac Elut SPS 24, Varian) at a pressure of 0.52 kg cm^{-2}. After conditioning, successively, with methanol (20 mL) and distilled water (20 mL), the SPE cartridge was loaded with the crude extracts (4 mL). After adsorption, fractionation was performed by stepwise elution with 40 mL of each of the following solvents: distilled water, 50 % methanol (*v*/*v* in distilled water), 100 % methanol, dichloromethane/methanol 50:50 (*v*/*v*) and 100 % dichloromethane. Each crude extract was purified four times to accumulate fractions in sufficient weight: the same eluted fractions were pooled and evaporated under reduced pressure at 40 °C using a rotary evaporator (R-3000, Büchi, Switzerland). Each fraction was redissolved in the appropriate solvent and freeze-dried prior to further analyses.

Quantity and quality of extracted phenolics

Determination of the total phenolic contents and Folin–Ciocalteu assay The total phenolic content of all extracts was determined colorimetrically (Labsystems, Multiskan MS, Finland) with a microplate-adapted Folin–Ciocalteu assay (Sanoner et al. 1999), which is known to be little affected by interfering compounds. Interfering substances, however, are thought to account for less than 5 % of the Folin–Ciocalteu-reactive compounds in brown seaweeds (Toth and Pavia 2001). Phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene, Sigma, France) was used as a standard, and concentrations were determined in each extract by freeze-drying three aliquots of 1 mL. Total phenolic contents (TPCs) were expressed as percentages of phenolic compounds in the DW of the aliquot or the algae.

NMR analysis of extracts The overall structural composition of crude extracts was assessed by means of ^{1}H NMR analyses on a Bruker Avance 400 using the standard pulse sequences available in the Bruker software (Bruker, France). All spectra were recorded in MeOD, at room temperature. Chemical shifts were expressed in parts per million. NMR profiles unambiguously indicate the PC within the extracts, with peak(s) between 5.5 and 6.5 ppm. The nature of the phlorotannins present in the MeOH–water fractions was established using heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC), heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) experiments and comparison of the chemical shifts of the ^{1}H and ^{13}C resonances with literature data (Cérantola et al. 2006). All spectra were recorded in MeOD, at 25 °C.

Activity measurements on extracts

From a general point of view, the antioxidant/radical scavenging tests carried out on algal crude extract and/or semi-purified fractions are based on both the determination of products resulting from the oxidation and the measurement of the efficiency of a substance to trap radicals (Huang et al. 2005).

We used several different tests in our study, with the aim of revealing different types of mechanisms in the action of phenolic compounds: DPPH radical scavenging assay, reducing power, superoxide anion-scavenging capacity assay (xanthine oxidase (XO) activity assay) and β-carotene bleaching method. Our assays included those based on electron-transfer reactions (DPPH and reducing power) together with an assay involving hydrogen atom transfer reactions (β-carotene bleaching method), as described by Huang et al. (2005). The first two types measure the capacity of an antioxidant to reduce an oxidant, which changes colour when reduced, while the second type uses a competitive reaction scheme in which antioxidant and substrate compete for thermally generated peroxyl radicals through the decomposition of azo compounds (Huang et al. 2005). DPPH and reducing power tests give insight into the levels of the lipophilic and hydrophilic compounds, whereas BCBM assesses the levels of lipophilic compounds alone (Chew et al. 2008). The XO activity assay measures another ROS scavenging capacity: the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) is generated by a xanthine oxidase/hypoxanthine system and reduces nitroblue tetrazolium (NBT) to blue formazon if no competitor, i.e. an antioxidant substance (the

sample), is added (Huang et al. 2005). Even though O_2^- is not the most damaging ROS, it is an initiator of highly detrimental ROS production such as singlet oxygen, hydroxyl radical (HO·) and peroxynitrate (OONO–) and could thus increase the oxidation risk indirectly (Huang et al. 2005).

DPPH radical scavenging assay The DPPH radical scavenging assay, modified according to Le Lann et al. (2008), was used to determine the radical scavenging activities in extracts and purified SPE fractions. The positive controls used were ascorbic acid (Sigma, France), α-tocopherol (Sigma), butylated hydroxyl-anisole (BHA) and butylated hydroxyl-toluene (BHT) (respectively, 2(3)-*t*-Butyl-4-hydroxyanisole, 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol; Sigma France). The protocol was microplate-adapted for faster use and to decrease sample preparation time. Briefly, five dilutions from 0.1 to 2 mg mL^{-1} of the extracts were prepared in triplicate before addition to 12 μL aliquots of 150 μM DPPH radical (222 μL). The mixture was stored in the dark for 60 min prior to absorbance measurement at 540 nm. Distilled water was used as a negative control. All samples were assayed in triplicate. Antioxidant activity was expressed as the IC50 (the concentration of substrate that causes a 50 % loss of DPPH activity): the lower the IC50 is, the stronger the antioxidant activity. Extracts with an IC50 higher than 10 mg mL^{-1} were considered as non-active extracts.

β-Carotene bleaching method The antioxidant activities of extracts and controls were measured by the β-carotene bleaching microplate-adapted method, modified in accordance with Kaur and Kapoor (2002) and Koleva et al. (2002). Two mL of a β-carotene solution in chloroform (0.1 mg mL^{-1}) were added to round-bottom flasks containing 20 mg of linoleic acid and 200 mg of Tween 40. After evaporation with a rotavapor, oxygenated distilled water (50 mL) was added, and the mixture was shaken to form a liposome solution. This mixture was added to each of the following: 12 μL of the extracts, positive controls (α-tocopherol, BHA and BHT) and negative controls (distilled water and ethanol). The absorbance of the solution at 450 nm was measured immediately (t=0 min) and after 2 h at 50 °C (t=120 min). All samples were assayed in triplicate. Antioxidant activity was expressed through the antioxidant activity coefficient (AAC), calculated as follows (Eq. 1):

$$\mathrm{AAC} = \left[\frac{\mathrm{As}_{(120)} - \mathrm{Ac}_{(120)}}{\mathrm{Ac}_{(0)} - \mathrm{Ac}_{(120)}}\right] \times 1,000 \quad (1)$$

where $As_{(120)}$ is the absorbance of the antioxidant mix at t=120 min, $Ac_{(120)}$ is the absorbance of the control at t=120 min and $Ac_{(0)}$ is the absorbance of the control at t=0 min. Since the positive controls, BHA, BHT and vit E had an average AAC of 700, this value was arbitrarily chosen to express the antioxidant activity as AAC_{700}, as in Le Lann et al. (2008). So, AAC_{700} was the concentration of substrate needed to obtain an AAC value of 700 (Tanniou et al. 2013). A high AAC_{700} was therefore considered as indicative of a weak antioxidant activity.

Reducing power The reducing capacity of each extract was assessed by the method adapted by Zubia et al. (2009) and Kuda et al. (2005). In a 96-well microplate, aliquots of extracts (25 μL) were mixed with phosphate buffer (25 μL, 0.2 M, pH 6.6) and potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$) (25 μL, 1 %). After incubation at 50 °C for 20 min, the microplate was cooled down prior to the addition of 25 μL trichloroacetic acid (10 %). Then, 25 μL 0.1 % $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ and 100 μL water were added to each well. The increase of absorbance, which indicates an increase in reducing activity was read at 620 nm after 10 min at room temperature. Results were expressed as the EC50 value (mg mL^{-1}) (Oueslati et al. 2012), which is the effective concentration at which the absorbance was 0.5 for reducing power. This assay was carried out in triplicate for each sample and the positive controls (BHA, BHT, vit E and vit C).

Superoxide anion-scavenging activity The superoxide anion-scavenging assay was carried out according to the method of Nagai et al. (2003). The reaction mixture consisted of 203 μL 0.05 M Tris–HCl buffer (pH 7.5), 57 μL 5 mM hypoxanthine, 30 μL 0.33 mM NBT and 13 μL of the sample. After incubation at 25 °C for 10 min, the reaction was started by adding 30 μL xanthine oxidase and keeping the temperature at 25 °C for 21 min. The absorbance was measured every 3 min for 21 min at 560 nm. The inhibition ratio (%) was calculated from the following equation (Chua et al. 2008):

$$\%\,\text{inhibition} = \left[\frac{\text{rate of control} - \text{rate of test sample}}{\text{rate of control}}\right] \times 100 \quad (2)$$

Results were then expressed as IC50 (the concentration of substrate that causes a 50 % inhibition).

Antibacterial tests

Algal extracts at five different concentrations, from 50 to 150 μg mL^{-1}, were tested for inhibitory activity against three marine bacterial strains obtained from the Ifremer collection: *Vibrio aestuarianus* (S02-041), *Vibrio anguillarum* (S11-054) and *Vibrio parahaemolyticus* (S12-011); and three terrestrial strains: *Escherichia coli* (T05-006, ATCC8739), *Staphylococcus aureus* (T05-007, ATCC 65388) and *Pseudomonas aeruginosa* (T05-005, ATCC15442). Each treatment

and control was replicated four times. Extracts were incubated for 24 h with the bacteria in exponential growth phase (at 2×10^8 UFC mL^{-1}) in 96-well plates (VWR) in LB medium (Luria Hinton Broth, Sigma, UK), supplemented with NaCl (35 g L^{-1}) for the marine strains, at 21 or 37 °C for marine or terrestrial strains, respectively. The antibiotic chloramphenicol was used as a control, at the same concentration as the tested extracts. Only the results for the smaller concentration (50 µg mL^{-1}) are presented here.

Statistics

All analyses were carried out in tri- or quadruplicate, and their results are presented as mean values±standard deviation (SD), using Statistica 8 (StatSoft ®) software for PC. Depending on the variable, means were calculated using three or four values/measurements per extract and were used for the statistical analysis. Homogeneity of variance was tested with the Brown–Forsythe test at the 0.05 error risk. Data that did not satisfy the criteria of normality and homoscedasticity for parametric tests were square root transformed before further analyses. One-way nested ANOVAs, with sites nested within countries, were performed on the data concerning the crude extract. For the semi-purified extract, simple one-way ANOVAs were performed to compare differences among sites in each country. When ANOVA demonstrated significant difference, post hoc Tukey HSD tests were carried out to identify which means contributed to the effect.

Chemicals

All reagents used in the experiments were of analytical grade and most were obtained from Sigma. Solvents used for extraction of algae samples were purchased from Fisher Scientific. Water used was of Millipore quality.

Results

Distinction between countries regarding the crude extracts

Country of sampling had a significant effect on the TPCs found in *S. muticum* (one-way ANOVA, $p<0.001$, Fig. 2). *S. muticum* populations from the different sampled countries were ranked by their level of phenolic content as follows: Portugal>Norway>France=Ireland=Spain (post hoc Tukey). The highest TPCs were observed at the extremes of the latitudinal gradient, which correspond to the edges of the distribution range of the species, i.e. Norway (1.79±0.28 % DW_{algae}) and Portugal (3.40±0.91 % DW_{algae}). Phenolic content reached 1.26±0.11 for France and the minimum concentration is observed for Spain with 0.66±0.15 % DW_{algae}. Inter-site variations was also observed, especially in Portugal,

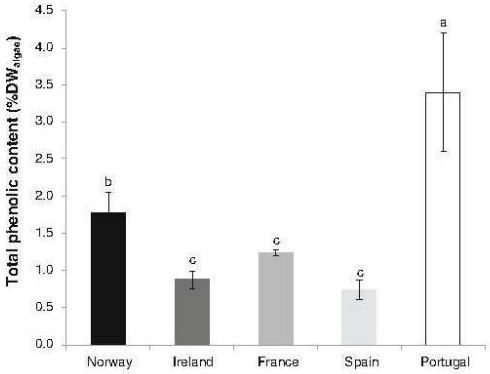


Fig. 2 Spatial variability of phenolic content of crude extracts from *S. muticum* collected along the Atlantic coasts of Europe from Portugal to Norway. Data (mean values per country±standard deviation) were analysed using one-way ANOVA followed by post hoc Tukey tests. (a–c) *Different letters* indicate significant differences

where phenolic content varied from 2.46±0.16 to 4.28±0.26 % DW_{algae}.

In addition to the algal phenolic concentration, it is interesting to examine an extract containing the maximum PC. Based on such extracts, the results are expressed in %DW where the dry weight is that of the concentrated extract. As above, great differences in maximum PC were observed among the countries (one-way nested ANOVA, $p<0.001$, Fig. 3a). Thus, the maximum is observed for Portugal where the total phenolic content reached more than 17 % of the fraction dry weight (17.49±0.49 % $DW_{fraction}$ for site 2): in Portugal phenolics represent more than 15.85 % on average, whereas this content reached 13.06, 10.69, 8.25 and 7.29 % in Norway, France, Ireland and Spain, respectively (Fig. 3a).

The antioxidant activity of *S. muticum* extracts differed among countries (one-way ANOVA, $p<0.001$). According to the ANOVA post hoc Tukey test ($p<0.05$), the AAC700 following the β-carotene bleaching method (AAC_{700}) in the extracts was superior to those of all the positive controls, showing that those extracts have very low antioxidant activity ($p<0.001$, Fig. 3b). In the same way, radical scavenging activity differed among countries (one-way ANOVA, $p<0.001$). Activity of crude extracts differed from the positive controls (post hoc Tukey test, $p<0.001$). However, some extracts showed activities close to those of the positive controls: the radical scavenging activity determined by DPPH method (IC50) was the highest in extracts from Norway and Portugal, with 0.44±0.03, 0.41±0.03 and 0.46±0.01 mg mL^{-1} for the sites 2 and 3 of Norway and the site 1 of Portugal, respectively (Fig. 3c). As previously seen for the phenolic content, the most active extracts are those of the extreme countries, followed by France, Spain and finally

the less active extracts, those from algae collected in Ireland (0.75±0.01, 0.94±0.02 and 0.84±0.02 mg mL^{-1} for sites 1, 2 and 3, respectively). This tendency is confirmed by the results of the reducing activity assay (Fig. 3d) showing that the highest reducing activity was displayed by the extracts from Norway and Portugal (0.079±0.01, 0.074±0.01, 0.082±0.01 and 0.086±0.01, 0.082±0.01, 0.079±0.01 mg mL^{-1} for the sites 1, 2 and 3 of Norway and Portugal, respectively). Moreover, according to the statistical analysis, this reducing activity is equivalent to those displayed by the positive controls (0.10±0.01; 0.086±0.01; 0.092±0.01; 0.13±0.01 mg mL^{-1} for BHA, BHT, vit E and vit C, respectively). Finally, XO inhibition also depends on the country of origin of the samples (Fig. 3e). Only extracts from Norway and Portugal displayed activities that can be compared to the positive controls (0.20±0.01, 0.19±0.01, 0.17±0.01 and 0.29±0.01,

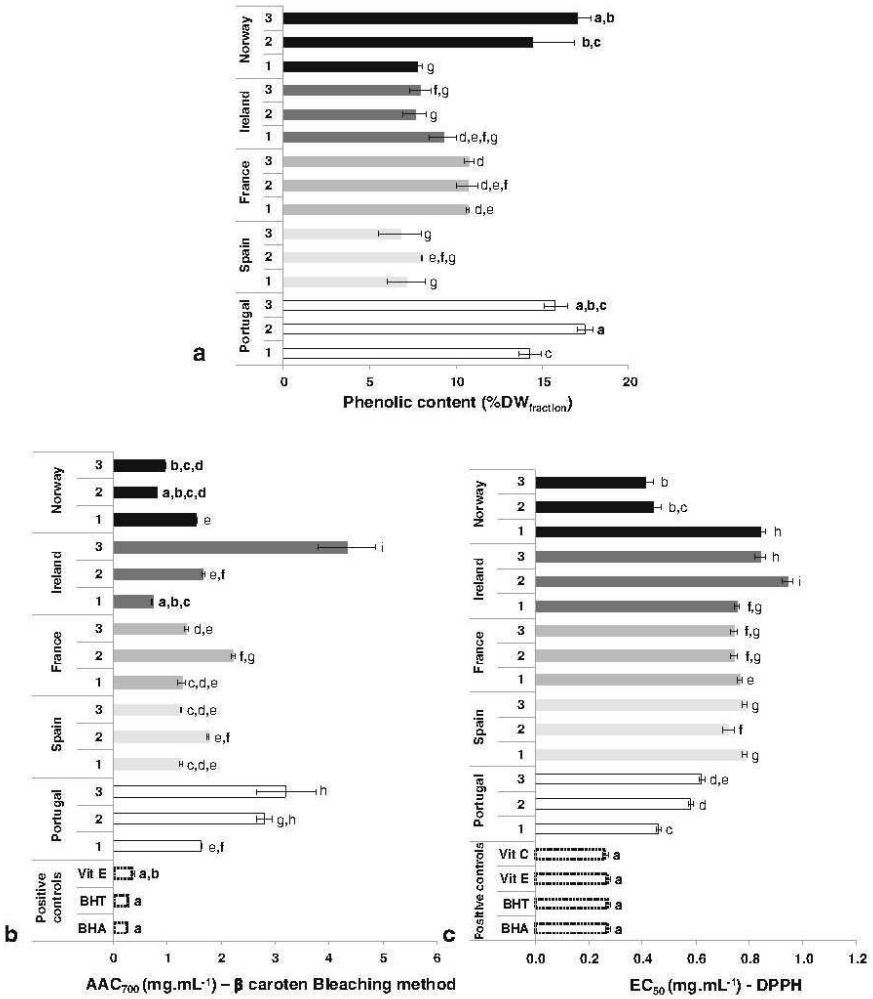


Fig. 3 Phenolic content (**a**) and screening of several antioxidant activities measured on phenolic extracts from *S. muticum* collected along the Atlantic coasts of Europe from Norway to Portugal, using the β-carotene bleaching test (**b**), radical scavenging activity (**c**), reducing power (**d**) and XO activity (**e**). Data were analyzed using one-way nested ANOVA followed by post hoc Tukey tests. (a–k) *Different letters* indicate significant differences

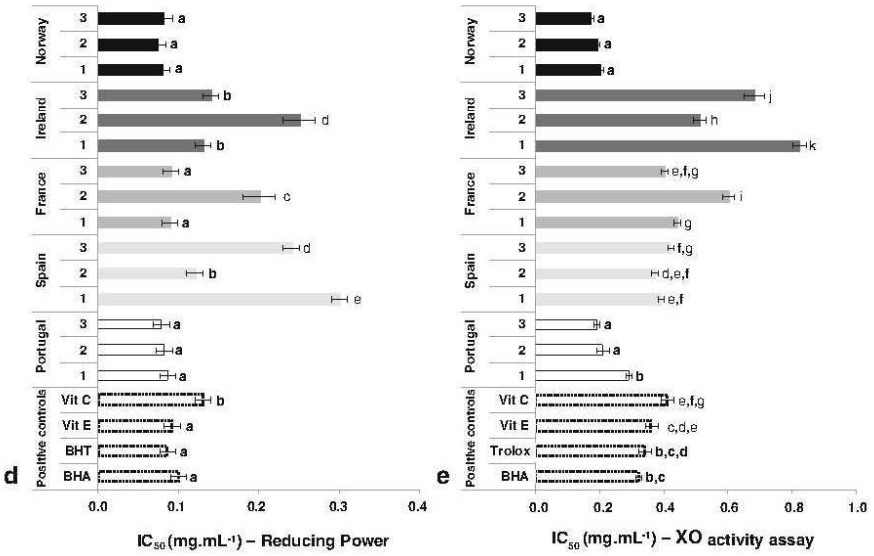


Fig. 3 continued.

0.21±0.02, 0.19±0.01 mg mL^{-1} for sites 1, 2 and 3 of Norway and Portugal, respectively).

Inter-country differences in the purified extracts

Figure 4 shows the phenolic polarity repartition in fractions obtained after an SPE procedure. Depending on the country of origin, the majority of the phenolics were found in the water, methanol–water or methanol fraction. Thus, for Norway, France and Portugal, compounds were present in the water fraction in small quantity (means: 0.53±0.11, 0.095±0.03 and 0.56±0.25 % DW_{algae} for Norway, France and Portugal, respectively) but with the majority in the MeOH–water fraction (means: 0.82±0.19, 0.44±0.06 and 1.45±0.37 % DW_{algae} for Norway, France and Portugal, respectively). For Ireland, apart from the site 1, the great majority of the phenolic compounds were found in the MeOH fraction. For Spanish extracts, the same quantities were present in the water and MeOH–water fractions, representing approximately 0.15 % DW_{algae}.

Only the results of antioxidant assays and radical scavenging activities will be presented for the purified fractions, other anti-ROS activities were not measured on purified extracts. Only *S. muticum* from Norway and Portugal contained high amounts of active phenolics, so only the results for these two countries are presented in Table 2. Radical scavenging activities (determined by the DPPH method and using IC50 to calculate the activity) were always better in purified fractions than in the crude extracts and were close to those of the positive controls. In addition, the MeOH–water fraction was more active than the MeOH one in almost all cases. Thus, the best radical scavenging activities were displayed by MeOH–water fraction from sites 2 and 3 in Norway (0.28±0.02; 0.27 ±0.02 mg mL^{-1}, respectively), by the MeOH fraction from site 2 in Portugal (0.25±0.03 mg mL^{-1}) and by the MeOH–water fraction from site 3 in Portugal (0.25±0.01 mg mL^{-1}). As for the crude extracts, for both these countries, antioxidant activities determined by the β-carotene bleaching method (ACC_{700}) were very low and dissimilar to the positive controls. From here on, we will focus on the most active fractions (MeOH–water and MeOH), which contain sufficient PC.

Antibacterial activities were dependent on country and varied strongly among sites within country (Table 3). Thus, if we focus on marine strains, almost all extracts, i.e. both crude and purified, possessed activities against *V. aestuarianus* and *V. anguillarum*. Conversely, few extracts were active against *V. parahaemolyticus*: only crude extracts from Ireland (all sites) and from sites 2 and 3 in Portugal displayed good activities (>50 % bacterial growth inhibition) against this strain. In many cases, the purified extracts were less active than the crude extracts, depending both on the country and on the studied strain. When purified extracts showed higher activity, it was always from the MeOH fractions. For the terrestrial strains, in the case of

Fig. 4 Spatial variability of phenolic content determined on crude and ▶ SPE-purified extracts from *S. muticum* collected along the Atlantic coasts of Norway (**a**), Ireland (**b**), France (**c**), Spain (**d**) and Portugal (**e**). For each country, data were analysed using one-way ANOVA followed by post hoc Tukey tests. (a–j) *Different letters* indicate significant differences

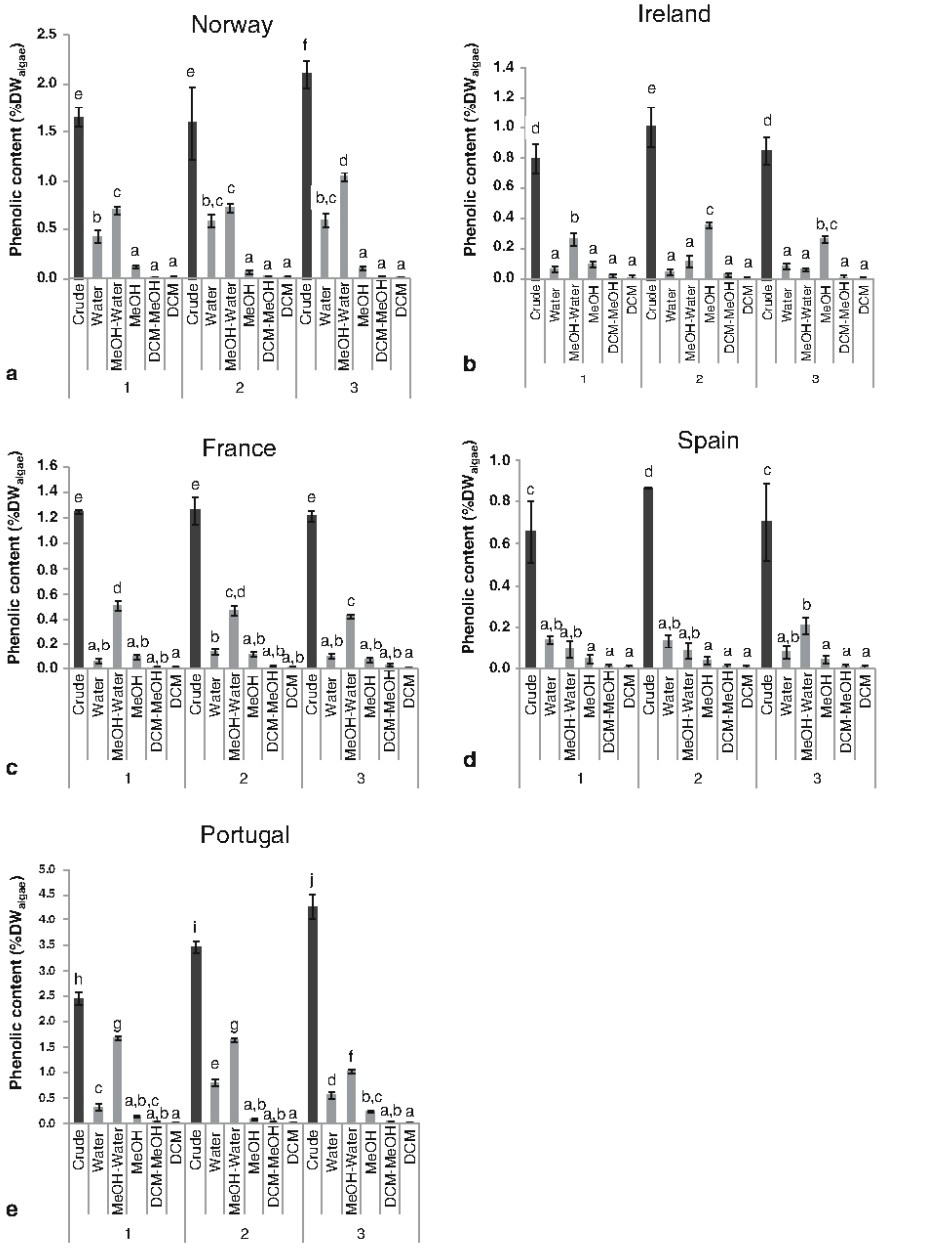

Norway
Ireland
France
Spain
Portugal
Phenolic content (%DW algae)
Crude
Water
MeOH-Water
MeOH
DCM-MeOH
DCM
1
2
3
a
b
c
d
e

Table 2 Antioxidant activities measured using solid phase extraction (SPE) purified polar extracts from *S. muticum* collected along the European Atlantic coasts, from Portugal to Norway. Data were analysed using one-way nested ANOVA followed by post hoc Tukey tests

Variable	Countries	Fractions	Means values±SD Tukey HSD ($p<0.05$)		
			Site 1	Site 2	Site 3
DPPH IC 50 (mg mL^{-1})	Norway	Crude	0.84±0.02 (h)	0.44±0.03 (d,e)	0.41±0.03 (d,e)
		MeOH–water	0.39±0.02 (c,d)	*0.28±0.02 (a,b)*	*0.27±0.02 (a,b)*
		MeOH	0.51±0.03 (f)	0.54±0.03 (f)	0.41±0.03 (d,e)
	Portugal	Crude	0.46±0.01 (e,f)	0.58±0.01 (g)	0.62±0.01 (g)
		MeOH–water	*0.33±0.01 (b,c)*	*0.33±0.01 (b,c)*	*0.25±0.01 (a)*
		MeOH	0.43±0.03 (d,e)	*0.25±0.03 (a)*	0.46±0.03 (e,f)
	Positive controls	BHA	0.27±0.01 (a,b)		
		BHT	0.27±0.01 (a,b)		
		Vit C	0.26±0.01 (a,b)		
		Vit E	0.26±0.01 (a,b)		
β-carotene AAC_{700} (mg mL^{-1})	Norway	Crude	1.53±0.01 (e)	0.79±0.01 (b,c)	0.94±0.02 (b,c)
		MeOH–water	1.65±0.01 (e,f)	1.33±0.01 (e)	1.74±0.01 (e,f,g)
		MeOH	1.10±0.01 (c,d)	1.33±0.01 (e)	1.07±0.01 (c,d)
	Portugal	Crude	1.63±0.01 (e,f)	2.80±0.14 (h)	3.20±0.55 (i)
		MeOH–water	2.06±0.01 (g)	1.63±0.01 (e,f)	1.41±0.01 (d,e)
		MeOH	1.93±0.01 (f,g)	0.93±0.01 (b,c)	1.48±0.01 (e)
	Positive controls	BHA	0.25±0.01 (a)		
		BHT	0.26±0.01 (a)		
		Vit C	0.26±0.01 (a)		
		Vit E	0.26±0.01 (a)		

The most active extracts/fractions compared with the positive controls are presented in italics. Different letters indicate significant differences among extracts for each variable (i.e. activity test)

S. aureus strains, the purified extracts were more active than the crude ones for all the countries tested, except Ireland. Norwegian and Irish extracts showed very high activities against *E. coli*. Interestingly, all the crude extracts were active against *P. aeruginosa*.

Identification of active phlorotannins from Norway, France and Portugal

Figure 5 shows the spectrum obtained using ^{1}H NMR to analyse active fractions from Norway, France and Portugal. In crude and purified extracts, PCs are visible between 5.5 and 6.5 ppm. In both purified extracts, the two phlorotannin profiles seem to be very similar (Fig. 5b). In the chosen active purified fractions, i.e. for the MeOH–water ones, phenolics were always present and the two profiles were always quite similar. In addition, the separation by polarity allows the removal of a great amount of mannitol, which is prevalent in crude extracts.

Results from the two dimensional NMR analysis (HMBC) showed that the purified extracts from *S. muticum* collected in Norway, France and Portugal were all rich in phlorethol(s) (Fig. 6) and that these compounds seem not to be linear (Cérantola et al. 2006).

For these two types of analyses (^{1}H NMR and 2D NMR), the small quantity of compound present in extracts of samples from Ireland and Spain did not allow clear signals to be obtained in the aromatic area. These minor signals are masked by other more abundant molecules. Despite the low anti-ROS activities of the extracts from France, these results are presented here for information purposes, to see whether phenolic compounds produced by French populations are of the same type as from Portuguese and Norwegian populations. Some small differences were visible between spectra obtained from French, Portuguese and Norwegian populations (Fig. 6). Using HMBC, Norwegian and French populations can be seen to be similar and separated from the Portuguese population; using HMQC, the three populations appear quite similar, but with differences remaining in the general phlorotannin profiles.

Discussion

Activities of the crude extracts

This study examined the effect of the country and site of sampling on the TPC, antioxidant and antibacterial activities

Table 3 Bioassays for the antibacterial activities of crude or SPE-purified extracts (fractions MeOH-water and methanol) for the three sites in each of the five studied countries along the Atlantic coasts. SPE: solid phase extraction. ns: no activity

	Norway-site 1			Norway-site 2			Norway-site 3			Ireland-site 1			Ireland-site 2			Ireland-site 3		
	Crude	M-W	M	Crude	M-W	M	Crude	M-W	M	Crude	M-W	M	Crude	M-W	M	Crude	M-W	M
02-041	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	+	++	+	+	+++	+	+
11-054	++	++	+	+	++	++	++	–	++	++	++	+	++	++	++	++	++	–
12-011	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+++	–	–	++	–	–	++	–	–
T007	–	++	+	–	+	+	+	++	++	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+
T006	++	+++	+++	+	+	+++	++	+++	+++	–	+++	+++	–	++	+++	–	+++	+++
T005	++	ns	Ns	+++	ns	ns	++	ns	ns	++	ns	ns	+++	ns	ns	+++	ns	ns
	France-site 1			France-site 2			France-site 3			Spain-site 1			Spain-site 2			Spain-site 3		
	Crude	M-W	M	Crude	M-W	M	Crude	M-W	M	Crude	M-W	M	Crude	M-W	M	Crude	M-W	M
02-041	–	+	++	+	++	+++	+	++	+++	+	+	+++	+	+	+	–	+	+
11-054	+	+	+	++	+	+	+	+	+	++	++	+	–	+	++	++	+	+
12-011	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–
T007	–	++	++	–	++	+++	–	++	+	–	+++	++	–	++	+++	+	++	++
T006	–	++	–	–	+	–	–	–	–	+	+++	–	+++	++	–	+++	+	–
T005	++	ns	Ns	+++	ns	ns	+	ns	ns	+++	ns	ns	++	ns	ns	++	ns	ns
	Portugal-Site 1			Portugal-Site 2			Portugal-Site 3											
	Crude	M-W	M	Crude	M-W	M	Crude	M-W	M									
02-041	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++									
11-054	++	+	+	++	+	+	++	–	+									
12-011	+	–	–	++	–	–	++	+	–									
T007	+	+	+	+	+	++	–	+	+									
T006	++	++	++	+++	+	+	+++	+	–									
T005	++	ns	Ns	+++	ns	ns	++	ns	ns									

Marine bacterial strains 02–041, *V. aestuarianus*; 11–054, *V. anguillarum*; 12–011, *V. parahaemolyticus*; terrestrial bacterial strains T007, *S. aureus*; T006, *E. coli*; T005, *P. aeruginosa*; M-W and M, methanol–water and methanol fractions, respectively, after SPE purification. Antibiotic chloramphenicol at 50 μg mL^{-1} inhibited growth by >75 % for all strains (marine and terrestrial)

+++ >75 %, ++ 50–75 %, + 25–50 %, − <25 % bacterial growth

of *S. muticum* extracts. The screening procedure also provided us with a way to identify the best extracts for later application, and also to know whether exploitation of this species would be viable all the countries in the study.

The anti-ROS tests showed that at the selected sampling period the extracts were quite active. Crude extracts had very good reducing activities and anti-XO comparable to activities measured for positive controls used in industry (BHA, BHT, vit E and vit C for the reducing power and Trolox for the XO test). The best activities were shown by the extracts from the extremities of the gradient, i.e., Norway and Portugal; this was also where the phenolic compound concentrations were highest, showing the important role of these compounds in the detected activities. Moreover, extracts from samples taken in France also showed good reducing activities, in accordance with the phenolic concentrations in the extracts. Even though the PC concentration was lower in France than in these two other countries, it was still more than 1 % of the dry weight of the seaweed. Here, only a small quantity of phenolics was extracted from seaweeds compared with what has been shown to be possible in other studies on the same species (Connan et al. 2004; Plouguerné et al. 2006; Parys et al. 2009), it can be understandable by the chosen sampling period. Indeed it has been known for a long time that the quantity of phenolics contained in seaweeds is largely dependent on the season and environmental parameters in general (Jormalainen and Honkanen 2001; Hemmi and Jormalainen 2004; Fairhead et al. 2005; Connan et al. 2007). Here, the collection period was chosen to sample individuals of *S. muticum* in a same physiological state along the European gradient studied. This approach was taken to enable the comparison of results and to avoid bias caused by reproduction; indeed, only immature individuals were collected. However, this period is not the most convenient for the production of a large quantity of PC by seaweeds, as shown by numerous authors (Connan et al. 2004; Plouguerné et al. 2006; Le Lann et al. 2012a). Nevertheless, crude extracts showed interesting antioxidant and antibacterial activities. Some extracts inhibited the growth of five bacterial strains by more than 50 % and some have activities equivalent to the one detected by the antibiotic, the chloramphenicol at the same concentration (50 μg mL^{-1}).

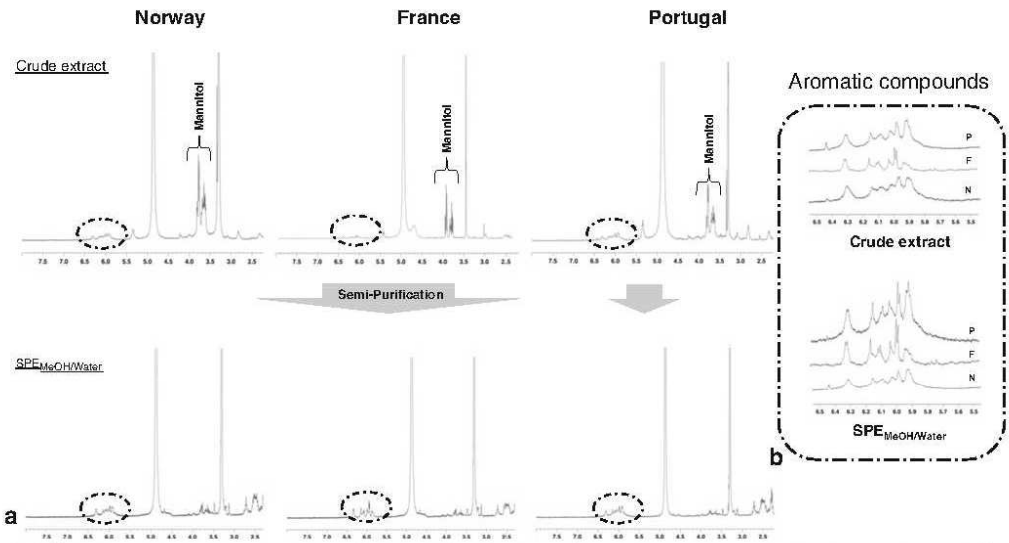


Fig. 5 ^{1}H NMR analysis of active crude and SPE purified extracts from *S. muticum* collected in Norway, France and Portugal (**a**) and enlargement of the aromatic area between 5.5 and 6.5 ppm for the crude and purified extracts (**b**). *N* Norway, *F* France and *P* Portugal

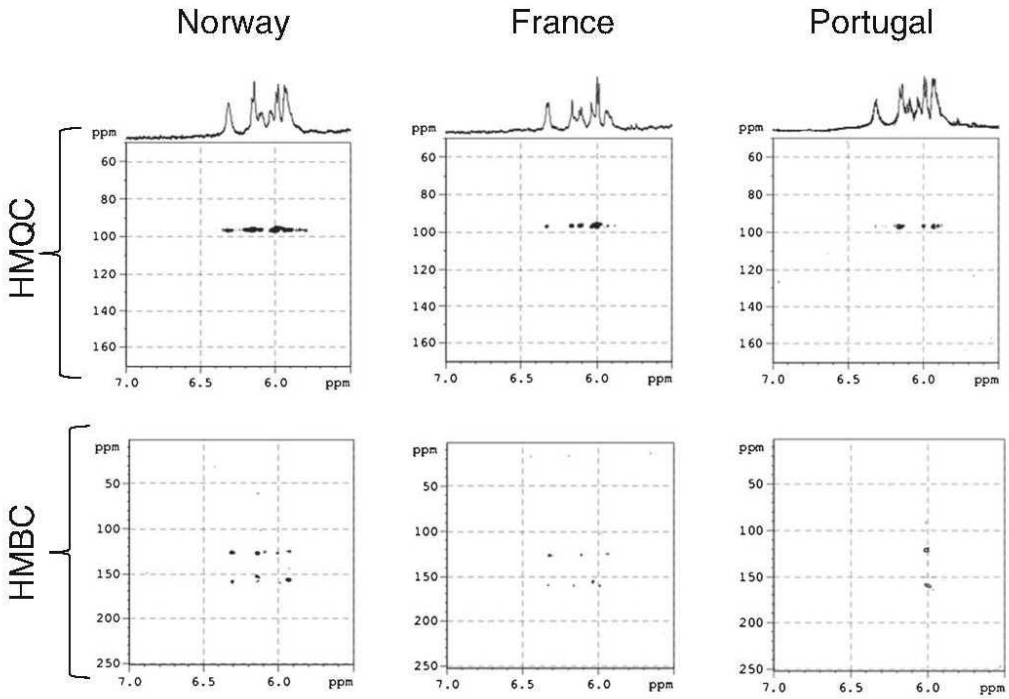


Fig. 6 The nature of the phlorotannins present in the MeOH–water fractions was established using heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) and heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) experiments

Activities of the purified extracts

The compound distribution by polarity seems rather similar from one country to another. The PCs were found for the greater part in the polar or quite apolar fractions, such as aqueous, methanol–water and methanolic fractions. This distribution was not identical among samples, which seems to indicate that the pool of extracted compounds does not consist of a single phenolic type. Indeed, as we have already shown for *S. muticum*, the pool of compounds can vary according to different parameters (Tanniou et al. 2013). The SPE is used as an assay here to separate molecules contained in the extract by polarity but also, therefore, to obtain one or several "cleansed" fractions concentrating the compounds of interests (here the PCs). One can note that there is an increase of the radical scavenging activities after purification, showing that phenolic compounds are responsible for the measured activities. These activities are comparable to those obtained with the positive controls, which are molecules used in industry. For the antioxidant activity results measured by the β-carotene bleaching method, no activity was measured after purification. As this test measures the activity of lipophilic molecules (Koleva et al. 2002; Le Lann et al. 2008), then the active compounds here would thus tend to be polar, or slightly apolar.

Extracts from all five countries showed evidence of bacterial inhibition. Extracts were active against three marine bacterial strains (*V. aestuarianus*, *V. anguillarum* and *V. parahaemolyticus*) and three terrestrial strains (*E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*). In this test, the most active extracts were no longer those from the gradient extremities. Indeed, if we look at the crude extracts, it was especially in those from Ireland and Portugal that we found the highest activities. For the purified extracts, only those with high anti-ROS activities and a large phenolic content were tested here. Yet, in the course of our experiments we found that many extracts were less active after purification. This would suggest that the compound(s) active against bacteria is/are not necessarily phenolic. Preliminary studies have described antibacterial activities for *S. muticum* extracts (Hellio et al. 2002, 2004a, b). For the same genus, some authors also demonstrated antibacterial activity of chloroform extracts (Sastry and Rao 1994). Plouguerné et al. (2008, 2010) also showed that non-polar extracts of *S. muticum* were the most active against bacterial strains. In our study, apolar extracts were not tested. The goal was to determine whether fractions containing PCs had antibacterial activities. In the literature, we find that phlorotannins isolated from *Sargassum vestitum* and *Sargassum natans* also have antifouling activity (Sieburth and Conover 1965; Jennings and Steinberg 1997). Our results showed that only a few extracts keep their antibacterial activities after purification. This is the case of the site 1 Portuguese extract tested against *V. aestuarianus* and *E. coli*, for example.

Taking into account all results, Norway and Portugal are the two countries where active phenolic compounds could be obtained in great quantity after separation. One could hypothesize that "extreme" environmental conditions along the Atlantic coasts could stress *S. muticum*, thus forcing it to produce more phenolic compounds to act as a defence against UV radiation and seawater temperature changes, for example. Indeed, if we take into account the tendencies observed during the study of the environmental parameters, we can propose some hypotheses regarding the factors that could influence phenolic content. In the chosen sampling periods, we noticed that the quantity of available radiation for photosynthesis was higher where we found the largest quantities of active CP, i.e. in the extremities of the gradient and in France. Other authors observed an effect of season, and thus probably of light levels (Connan et al. 2004; Plouguerné et al. 2006), on the production of CP as photoprotective molecules (De la Coba et al. 2009). Other parameters seem less correlated with the observed variations, although salinity has been cited by other authors as a factor that can influence and reduce phenolic content (Ragan and Glombitza 1986; Connan and Stengel 2011). Here, salinity was not correlated with lowered PC concentration, although the smallest content was for Spain, where salinity is the highest (up to 37 psu). The dates of colonization of *S. muticum* could also be taken in consideration. Indeed, this species spread northward and southward from the south of England starting in 1973. It has been post recently found on the north Portuguese coast (by 2002–2010) and in Norway around 2000. It is thus possible that at first, early in their arrival in new area, these seaweeds produce more defensive compounds to colonize their novel environment. In any case, it seems a little dangerous to draw general conclusions on the effect of geographical position and thus environmental parameters on the production of PC by *S. muticum*; indeed, numerous authors having demonstrated the existence of very small scale sources of variation, such as day/night or seasonal variation (Connan et al. 2004, 2007). Also, the expression of genes involved in PC biosynthesis occurs only a few hours after a light stimulation (E. Creis, personal communication). It would thus be necessary to repeat this study at another period of the year and/or make several samplings per day, to be able to identify the sources of variation in total phenolic content.

Identification of active phlorotannins from Norway, France and Portugal

The ^{1}H-NMR profiles show a great similarity between the spectra of Norway, France and Portugal. The 2D spectra allowed us to identify the phlorotannins produced by *S. muticum* as being of the phlorethol type, and HMBC revealed that they are rather not linear (Cérantola et al. 2006). It seems that *S. muticum* does not produce different compounds

according to geographical zones studied. According to quantitative analyses, only the amount varies. It is possible, considering phenolic content as a pool, that the relative proportions of the different compounds vary. This is easiest to see on the ^{1}H NMR spectra: the French PC profile (with visible peaks) is different from that of Portuguese and Norvegian populations in the aromatic area. Phenolic compounds have already been isolated and identified in certain brown seaweeds (Kang et al. 2005; Cérantola et al. 2006; Singh and Bharate 2006). Here, even if we know the overall structure of the isolated compounds, we still need to find out the number of repeated units within the molecules to really discern the structure of the present compounds. Mass spectrometry analyses are therefore currently in progress at the laboratory, which should provide us with answers regarding the various sizes of phlorethols present in extracts and also give an idea of the category of compounds varying according to the environmental conditions and thus the geographical position of *S. muticum*.

Spatial variation in levels of brown algal phenolic compounds has been examined at very different scales (Table 4). Van Alstyne et al. (1999) highlighted this by presenting number of various studies made in the field. Among these studies on the brown algae, *Sargassum* is a model classically studied for the variability of its phenolic content (Plouguerné et al. 2006; Le Lann et al. 2012), but, to our knowledge, no previous study has focused on the spatial variability of both the quantity and the quality of phlorotannins on a large scale (Atlantic coasts). Therefore, the present study allowed us to gain a first idea of the variability of this type of compound produced by a species on a large geographical scale. Studies on the variability of macromolecules (carbohydrates, lipids and proteins) of *S. muticum* along to the same gradient are now in progress. The results should provide an overview of compartments subject to variation for the same species according to its geographical position, especially in a context of global change.

Table 4 Different scales of spatial variation in levels of brown algal phenolic compounds according to published reports

Scale	Examples	Authors
Large	Interspecific variations between hemispheres	Steinberg (1989, 1992); Steinberg et al. (1995)
	Interspecific variations between temperate and tropical habitats	Steinberg (1986); Van Alstyne and Paul (1990); Targett et al. (1992)
Average	Inter- and intraspecific variations within a large geographical area (more than hundred km)	Pavia and Aberg (1996); Van Alstyne et al. (1999); Le Lann et al. (2011)
Small	Inter- and intraspecific variations between sites in the same country or small geographical area (ten to hundred km)	Steinberg (1989); Targett et al. (1992, 1995); Plouguerné et al. (2006); Connan et al. (2007); Le Lann et al. (2012a)

Future research

Phenolics or phlorotannins can have many applications in industry, correlated with their numerous properties: antidiabetic, anti-cancer, anti-oxidation, antibacterial, radioprotective and anti-HIV (Kohen and Nyska 2002; Nakai et al. 2006; Kuda et al. 2007; Kumar Chandini et al. 2008; Gupta and Abu-Ghannam 2011; Yong-Xin et al. 2011). Phloroglucinol can be used as a coupling agent in printing, in explosives and for the industrial synthesis of pharmaceuticals (Flopropione). The interest of this molecule makes it important to try to find ways of exploiting natural marine resources like seaweeds. However, numerous studies show that these compounds can vary a great deal in terms of polarity and structure, according to species of seaweed and even within the same species according to the environmental conditions (Jormalainen and Honkanen 2001; Hemmi and Jormalainen 2004; Fairhead et al. 2005; Connan et al. 2007). It is thus rather difficult to find a standard extraction protocol for all these compounds. Also, if we wanted to use them in the food or pharmaceutical industries, extraction and purification processes would need to comply with European requirements. In a previous study, Tanniou et al. (2013) demonstrated for the first time the unquestionable usefulness of using modern, solvent-free and environmentally friendly methods for the non-denaturing extraction of brown algal polyphenols, using *S. muticum* as a model. In particular, CPE and PLE seemed to be the most promising methods for the extraction of polyphenols with useful antioxidant potential. It will thus be necessary to replace the acetone–water extraction by one of these processes, for example. Finally, large biomasses of *S. muticum* are present at the northern and southern extremities of Europe. This available biomass contains a large amount of phenolics, which can be purified to a point where phenolic structure can be determined. The purified extracts have good anti-ROS and antibacterial activities and, consequently, could be very useful for future industrial applications. As we find *S. muticum* in great quantities on the Atlantic coasts, algal harvesting could be possible in Europe. However, the particular weather conditions of each country could represent an additional barrier. For example, it is difficult to have access to seaweeds all year long in Norway. The exploitation of this species would thus be easier in southern Europe, e.g. in Portugal. Besides being more easily accessible, our study showed seaweeds in this country are richer in phenolics. However, in countries such as Ireland, France and Spain, where the algae did not produce the highest amount of phenolics in our results, such exploitation would be a compromise. A solution could be the cultivation of *S. muticum* under controlled conditions which mimic natural stresses conditions (light intensity, temperature, etc) to force *S.*

muticum to produce phenolics in large quantities (metabolic forcing), thus making the exploitation of Irish, French and Spanish biomasses possible.

Conclusion

Our paper presents the first study taking into account the spatial variability of the phenolic compounds for one species along a large spatial scale and the potential of this species for a future use in industry as anti-ROS or anti-bacterial molecules. The most interesting extracts were those from Portuguese populations, which display the best anti-ROS activities after purification and contain a very large amount of PCs. *S. muticum* biomass is available in considerable quantities on Portuguese coasts where the environmental conditions (especially weather) allow it to be harvested easily for a large part of the year. This brown invasive macroalga, which caused environmental disturbance when it arrived, could finally become a valuable marine resource for European countries.

Acknowledgments This study is part of the PhD. thesis work carried out by the first author at the Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR UMR 6539), which is part of the IUEM (UBO-UEB). It was supported by the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (UBO grant to the first author). We would like to thank Helen McCombie-Boudry of the Bureau de Traduction de l'Université (BTU) of the University of Western Brittany, Brest, France for her fruitful assistance with the improvement of the English in this article. This study is related to two research projects: BIOTECMAR (Interreg IVB, 2009-2011) and INVASIVES (Era-net, 2012-2016).

References

Aruoma OI, Spencer JPE, Warren D, Jenner P, Butler J, Halliwell B (1997) Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. Food Chem 60:149–156

Bandonienė D, Pulaskas A, Veskutonis PR, Gruzdienė D (2000) Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. Food Res Int 33:785–791

Bourgougnon N, Stiger-Pouvreau, V (2011) Chapter 4: Chemodiversity and bioactivity within red and brown macroalgae along the French coasts, metropole and overseas departments and territories. In: Kim S.-K. (ed) Handbook of marine macroalgae: biotechnology and applied phycology. Wiley, New York, pp. 58–105

Cérantola S, Breton F, Ar Gall E, Deslandes E (2006) Co-occurrence and antioxidant activity of fucol and fucophlorethol classes of polymeric phenols in *Fucus spiralis*. Bot Mar 49:347–351

Chew YL, Lim YY, Omar M, Khoo KS (2008) Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. LWT-Food Sci Technol 41:1067–1072

Chua MT, Tung YT, Chang ST (2008) Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. Bioresour Technol 99:1918–1925

Connan S, Stengel DB (2011) Impacts of ambient salinity and copper on brown algae: 2. interactive effects on phenolic pool and assessment of metal binding capacity of phlorotannin. Aquat Toxicol 14:1–13

Connan S, Goulard F, Stiger V, Deslandes E, Ar Gall E (2004) Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. Bot Mar 47:410–416

Connan S, Deslandes E, Ar Gall E (2007) Influence of day–night and tidal cycles on phenol content and antioxidant capacity in three temperate intertidal brown seaweeds. J Exp Mar Biol Ecol 349: 359–369

De la Coba F, Aguilera J, Figueroa FL, de Galvez MV, Herrera E (2009) Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. J Appl Phycol 21:161–9

Engelen A, Espirito-Santo C, Simoes T, Monteiro C, Serrao EA, Pearson GA, Santos ROP (2008) Periodicity of propagule expulsion and settlement in the competing native and invasive brown seaweeds, *Cystoseira humilis* and *Sargassum muticum* (Phaeophyta). Eur J Phycol 43:275–282

Fairhead VA, Amsler CD, McClintock JB, Baker BJ (2005) Variation in phlorotannin content within two species of brown macroalgae (*Desmarestia anceps* and *D. menziesii*) from the Western Antarctic Peninsula. Polar Biol 28:680–686

Gupta S, Abu-Ghannam N (2011) Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. Trends Food Sci Technol 22:315–326

Hellio C, Berge JP, Beaupoil C, Le Gal Y, Bourgougnon N (2002) Screening of marine algal extracts for antisettlement activities against microalgae and macroalgae. Biofouling 18:205–215

Hellio C, Marechal JP, Véron B, Bremer G, Clare A, Le Gal Y (2004a) Seasonal variation of antifouling activities of marine algae from the Brittany coast (France). Mar Biotechnol 6:67–82

Hellio C, Simon Colin C, Clare AS, Deslandes E (2004b) Anti-settlement activities of *Grateloupia turuturu* hydroalcoholic extracts on cyprids of *Balanus amphitrite*. Biofouling 20:139–145

Hemmi A, Jormalainen V (2004) Geographic covariation of chemical quality of the host alga *Fucus vesiculosus* with fitness of the herbivorous isopod *Idotea baltica*. Mar Biol 145:759–768

Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem 53:1841–56

Incera M, Olabarria C, Troncoso JS, Lopez J (2009) Response of the invader *Sargassum muticum* to variability in nutrient supply. Mar Ecol Prog Ser 377:91–101

Ito N, Hirose M, Fukushima H, Tsuda T, Shirai T, Tatenatsu M (1986) Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogens. Food Chem Toxicol 24:1071–1092

Jennings JK, Steinberg PD (1997) Phlorotannins versus other factors affecting epiphyte abundance on the kelp *Ecklonia radiata*. Oecologia 109:461–473

Jormalainen V, Honkanen T (2001) Multiple cues for phenotypic plasticity in phlorotannin production of the bladder wrack *Fucus vesiculosus*. Phycologia 40:59–60

Kang KA, Lee KH, Chae S, Zhang R, Jung MS, Lee Y, Kim SY, Kim HS, Joo HG, Park JW, Ham YM, Lee NH, Hyun JW (2005) Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. FEBS Lett 579:6295–6304

Kaur C, Kapoor HC (2002) Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. Int J Food Sci Tech 37:153–161

Kohen R, Nyska A (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. Toxicol Pathol 30:620–650

Koivikko R, Loponen J, Honkanen T, Jormalainen V (2005) Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. J Chem Ecol 31:195–212

Koivikko R, Loponen J, Pihlaja K, Jormalainen V (2007) High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus*. Phytochem Anal 18:326–332

Koleva II, Van Beek TA, Linssen JPH (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochem Anal 13:8–17

Kraan S (2008) *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt in Ireland: an invasive species on the move. J Appl Phycol 20:825–832

Kuda T, Tsunekawa M, Hishi T, Araki Y (2005) Antioxidant properties of dried 'kayamo-nori', a brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). Food Chem 89: 617–622

Kuda T, Kunii T, Goto H (2007) Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Ecklonia stolonifera* and *Ecklonia kurome* products harvested and processed in the Noto Peninsula, Japan. Food Chem 103:900–905

Kumar Chandini S, Ganesan P, Bhaskar N (2008) *In vitro* antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. Food Chem 107:707–713

Le Lann K, Jégou C, Stiger-Pouvreau V (2008) Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R Ross. Phycol Res 56:238–245

Le Lann K, Ferret C, VanMee E, Spagnol C, Lhuillery M, Stiger-Pouvreau V (2012a) Total phenolic, size-fractionated phenolics and fucoxanthin content of tropical Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) from the South Pacific Ocean: spatial and specific variability. Phycol Res 60:37–50

Le Lann K, Connan S, Stiger-Pouvreau V (2012b) Phenology, TPC and size-fractioning phenolics variability in temperate Sargassaceae (Phaeophyceae, Fucales) from Western Brittany: Native versus introduced species. Mar Environ Res 80:1–11

Nagai T, Inoue R, Inoue H, Suzuki N (2003) Preparation and antioxidant properties of water extracts of propolis. Food Chem 80:29–33

Nakai M, Kagayama N, Nakahara K, Miki W (2006) Phlorotannins as radical scavengers from the extract of *Sargassum ringgoldianum*. Mar Biotechnol 8:409–414

Olabarria C, Rodil IF, Incera M, Troncoso JS (2009) Limited impact of *Sargassum muticum* on native algal assemblages from rocky intertidal shores. Mar Environ Res 67:153–158

Oueslati S, Trabelsi N, Boulaaba M, Legault J, Abdelly C, Ksouri R (2012) Evaluation of antioxidant activities of the edible and medicinal *Suaeda* species and related phenolic compounds. Ind Crop Prod 36:513–518

Parys S, Kehraus S, Pete R, Kupper FC, Glombitza KW, Konig GM (2009) Seasonal variation of polyphenolics in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). Eur J Phycol 44:331–338

Pavia H, Aberg P (1996) Spatial variation in polyphenolic content of *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyta). Hydrobiologia 326/327:199–203

Plouguerné E, Le Lann K, Connan S, Jechoux G, Deslandes E, Stiger-Pouvreau V (2006) Spatial and seasonal variation in density, reproductive status, length and phenolic content of the invasive brown macroalga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt along the coast of Western Brittany (France). Aquat Bot 85:337–344

Plouguerné E, Hellio C, Deslandes E, Véron B, Stiger-Pouvreau V (2008) Anti-microfouling activities in extracts of two invasive algae: *Grateloupia turuturu* and *Sargassum muticum*. Bot Mar 51: 202–208

Plouguerné E, Georgantea P, Ioannou E, Vagias C, Roussis V, Hellio C, Kraffe E, Stiger-Pouvreau V (2010) Anti-microfouling activity of lipidic metabolites from the invasive brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. Mar Biotechnol 12:52–61

Ragan MA, Glombitza KW (1986) Phlorotannins, brown algal polyphenols. Prog Phycol Res 4:129–241

Sanoner P, Guyot S, Marnet N (1999) Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). J Agric Food Chem 47:4847–4853

Sastry VMVS, Rao GRK (1994) Antibacterial substances from marine algae: successive extraction using benzene, chloroform and methanol. Bot Mar 37:357–360

Schoenwaelder MEA, Clayton MN (1998) Secretion of phenolic substances into the zygote wall and cell plate in embryos of *Hormosira* and *Acrocarpia* (Fucales, Phaeophyceae). J Phycol 34:969–980

Sieburth JM, Conover JT (1965) *Sargassum* tannin, an anti-biotic which retards fouling. Nature 208:52–53

Singh IP, Bharate SB (2006) Phloroglucinol compounds of natural origin. Nat Prod Rep 23:558–591

Steinberg PD (1986) Chemical defenses and the susceptibility of tropical brown algae to herbivores. Oecologia 69:628–630

Steinberg PD (1989) Biogeographical variation in brown algal polyphenolics and other secondary metabolites: comparison between temperate Australasia and North America. Oecologia 78:374–383

Steinberg PD (1992) Geographical variation in the interaction between marine herbivores and brown algal secondary metabolites. In: Paul VJ (ed) Ecological roles of marine natural products. Comstock, Ithaca, pp 51–92

Steinberg PD, Estes JA, Winter FC (1995) Evolutionary consequences of food chain length in kelp forest communities. Proc Natl Acad Sci USA 92:8145–8148

Stiger V, Deslandes E, Payri CE (2004) Phenolic contents of two brown algae, *Turbinaria ornata* and *Sargassum mangarevense* on Tahiti (French Polynesia): interspecific, ontogenic and spatio-temporal variations. Bot Mar 47:402–409

Tannion A, SerranoLeon E, Vandanjon L, Ibanez E, Mendiola JA, Cerantola S, Kervarec N, LaBarre S, Marchal L, Stiger-Pouvreau V (2013) Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model. Talanta 104:44–52

Targett NM, Arnold TM (2001) Effects of secondary metabolites on digestion in marine herbivores. In: McClintock JB, Baker BJ (eds) Marine chemical ecology. CRC, Boca Raton, pp 391–411

Targett NM, Coen LD, Boettcher AA, Tanner CE (1992) Biogeographic comparisons of marine algal phenolics: evidence against a latitudinal trend. Oecologia 89:464–470

Targett NM, Boettcher AA, Targett TE, Vrolijk NH (1995) Tropical marine herbivore assimilation of phenolic-rich plants. Oecologia 103:170–179

Toth GB, Pavia H (2001) Removal of dissolved brown algal phlorotannins using insoluble polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). J Chem Ecol 27:1899–1910

Van Alstyne KL, Paul VJ (1990) The biogeography of polyphenolic compounds in marine macroalgae: temperate brown algal defenses deter feeding by tropical herbivorous fishes. Oecologia 84:158–163

Van Alstyne KL, McCarthy JJ, Hustead CL, Duggins DO (1999) Geographic variation in polyphenolic levels of Northeastern Pacific kelps and rockweeds. Mar Biol 133:371–379

Yong-Xin L, Isuru W, Yong L, Se-Kwon K (2011) Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. Process Biochem 46:2219–2224

Zubia M, Fabre MS, Kerjean V, Le Lann K, Stiger-Pouvreau V, Fauchon M, Deslandes E (2009) Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. Food Chem 116:693–701

IV.3.3.2. Complément d'informations sur les résultats de purification par SPE des extraits de *Sargassum muticum* le long du gradient latitudinal

Les fractions issues de la semi-purification par SPE sont riches en composés phénoliques (Figure IV.19). Ceux-ci peuvent représenter plus de 50% du poids sec de la fraction la plus riche. C'est en particulier le cas de la fraction MeOH-Eau pour les extraits provenant du Portugal (Figure IV.19). Selon les pays étudiés, le degré de purification n'a pas la même efficacité. Par exemple, pour l'Irlande, la France et l'Espagne, la semi-purification n'apporte qu'un enrichissement de 7% maximum de la fraction en CP par rapport à l'extrait brut (Figure IV.19). C'est pour les extraits provenant de Norvège et du Portugal que la purification semble être la plus efficace : les fractions sont constituées à plus de 30% par des CP pour la Norvège et à plus de 50% pour le Portugal alors que pour ces deux pays, les extraits bruts étaient constitués à seulement 10-15% de composés phénoliques. A part deux cas (site 1 Irlande et site 1 France), les fractions les plus riches en CP sont les fractions hydro-méthanoliques.

NB : Ces graphiques donnent une information supplémentaire par rapport à la figure 4 de la publication (Tanniou *et al.*, 2013b ci-dessus). En effet, ils permettent de voir dans quelle mesure la purification permet de concentrer les CP en fonction de leurs polarités. Ainsi on peut voir à combien de % la fraction obtenue est composée en CP. Car au-delà de chercher un protocole de purification capable de conserver la majeure partie des composés présent dans l'algue initialement, il est important d'obtenir une fraction la plus « pure » possible c'est-à-dire composée en majorité de CP. Et ce, dans deux buts majeurs :

1) avoir un produit relativement pur utilisable tel quel par l'industrie ;

2) permettre des analyses plus poussées en RMN ou en spectrométrie de masse, ces analyse nécessitant d'avoir un extrait contenant en majorité le composé d'intérêt.

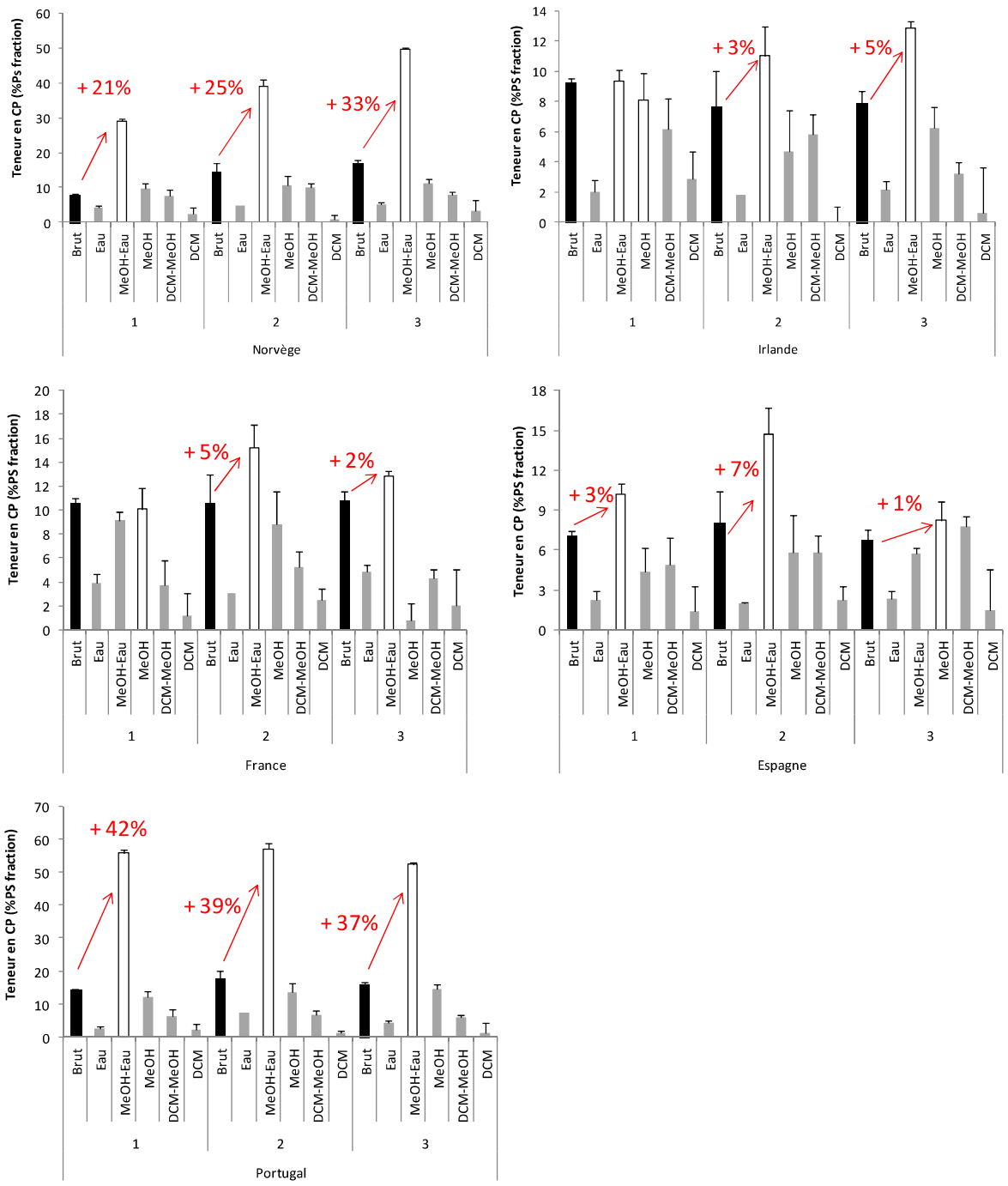


Figure IV.19. Variabilité spatiale de la teneur en composés phénoliques (en fonction du poids sec de la fraction) déterminée sur les extraits bruts et purifiés (purification sur colonne SPE) pour les extraits provenant de Norvège, Irlande, France, Espagne et Portugal. Les flèches rouges indiquent l'enrichissement des fractions en CP au cours de la purification (en pourcentage du poids sec de la fraction) lorsqu'une augmentation significative était visible. Le pourcentage indiqué correspond à la différence entre la valeur obtenue pour l'extrait purifié et celle de l'extrait brut. DCM, dichlorométhane ; Meth, méthanol.

Nous avons souhaité également présenter des résultats supplémentaires concernant les tests d'activités anti-radicalaire et antioxydante mesurées avant et après purification des extraits par SPE (Tableau IV.4).

Par rapport au tableau 2 de la publication de Tanniou *et al.* (2013b) (manuscrit présenté au paragraphe IV.3.3.1), ce tableau intègre en plus les données obtenues sur les échantillons de France. Ces données sont comparées à celles obtenues sur les échantillons de Norvège et du Portugal. Les activités anti-radicalaire et antioxydante mesurées sur les échantillons provenant d'Irlande et d'Espagne étant bien trop faibles par rapport aux témoins (>5 $mg.mL^{-1}$) elles seront considérées comme nulles et ne seront donc pas présentées ici.

Tableau IV.4. Activités anti-radicalaire et anti-oxydantes mesurées avant et après purification des extraits provenant des échantillons de *S.muticum* prélevées le long des cotes atlantiques. Les données sont analysées par le biais d'une ANOVA à un facteur suivie d'un test à posteriori de Tukey (p<0.05). Les fractions les plus actives sont indiquées en gras dans le Tableau. Les différentes lettres indiquent les différences significatives entre les extraits pour chacune des variables (c. à d. les tests d'activités).

			Moyennes ± ET Tukey HSD (p<0.05)		
Variable	Pays	Fractions	Site 1	Site 2	Site 3
DPPH	Norvège	Brut	0.84 ± 0.02 (h)	0.44 ± 0.03 (b,c,d)	0.41 ± 0.03 (b,c,d)
IC 50 (mg/mL)		MeOH-Eau	0.39 ± 0.02 (b,c)	**0.28 ± 0.02 (a)**	**0.27 ± 0.02 (a,b)**
		MeOH	0.51 ± 0.03 (d,e,f)	0.54 ± 0.03 (d,e)	0.41 ± 0.03 (b,c,d)
	France	Brut	0.76 ± 0.01 (j,k)	0.74 ± 0.01 (i,j,k)	0.74 ± 0.01 (i,j,k)
		MeOH-Eau	1.09 ± 0.01 (l)	0.65 ± 0.01 (g,h,i)	0.72 ± 0.02 (h,i,j)
		MeOH	0.50 ± 0.01 (d,e)	0.69 ± 0.01 (h,i,j)	5.24 ± 0.15 (m)
	Portugal	Brut	0.46 ± 0.01 (c,d)	0.58 ± 0.01 (f,e,g)	0.62 ± 0.01 (e,g,h)
		MeOH-Eau	**0.33 ± 0.01 (a,b)**	**0.33 ± 0.01 (a,b)**	**0.25 ± 0.01 (a)**
		MeOH	0.43 ± 0.03 (b,c,d)	**0.25 ± 0.03 (a)**	0.46 ± 0.03 (c,d)
	Contrôles positifs	BHA	0.27 ± 0.01 **(a)**		
		BHT	0.27 ± 0.01 **(a)**		
		Vit C	0.26 ± 0.01 **(a)**		
		Vit E	0.27 ± 0.01 **(a)**		
β-carotène	Norvège	Brut	1.53 ± 0.01 (h,i,j)	0.79 ± 0.01 (b,c)	0.94 ± 0.02 (b,c,d)
AAC_{700} (mg/mL)		MeOH-Eau	1.65 ± 0.01 (i,j,k,l)	1.33 ± 0.01 (h,i,j)	1.74 ± 0.01 (i,j,k,l,m)
		MeOH	1.10 ± 0.01 (d,e,f)	0.63 ± 0.01 (b)	1.07 ± 0.01 (c,d,e,f)
	France	Brut	1.26 ± 0.01 (e,f,g,h)	2.21 ± 0.01 (n,o)	1.36 ± 0.01 (f,g,h,i)
		MeOH-Eau	1.94 ± 0.01 (p,q)	1.89 ± 0.01 (k,l,m)	2.31 ± 0.01 (o)
		MeOH	1.60 ± 0.01 (i,j,k)	1.14 ± 0.01 (d,e,f,g)	9.30 ± 0.20 (r)
	Portugal	Brut	1.63 ± 0.01 (i,j,k)	2.80 ± 0.14 (p)	3.20 ± 0.55 (q)
		MeOH-Eau	2.06 ± 0.01 (m,n,o)	1.63 ± 0.01 (i,j,k,l)	1.41 ± 0.01 (g,h,i,j)
		MeOH	1.93 ± 0.01 (l,m,n)	0.93 ± 0.01 (b,c,d)	1.48 ± 0.01 (h,i,j)
	Contrôles positifs	BHA	0.25 ± 0.01 **(a)**		
		BHT	0.26 ± 0.01 **(a)**		
		Vit C	0.26 ± 0.01 **(a)**		
		Vit E	0.27 ± 0.02 **(a)**		

Le tableau IV.5 présente les résultats des différentes ANCOVA réalisées sur la teneur en composés phénoliques ainsi que sur leurs activités associées. On remarque que seul l'effet des facteurs fixes 'pays' et 'site' est significatif (p<0,05). Une analyse de corrélation de Pearson a donc été réalisée afin de mettre en avant l'effet des autres paramètres (Tableau IV.6). Ici, on peut voir que la teneur en CP chez *Sargassum muticum* est positivement corrélée avec l'intensité lumineuse (r=0.73 à p<0.01) ainsi qu'avec la température de l'eau de mer (r=0.61 à p<0.01) et la salinité (r=0.48 à p<0.01). La richesse en CP des extraits bruts est également corrélée positivement avec la température (p<0.05) et l'intensité lumineuse (p<0,01). L'activité anti-radicalaire, le pouvoir réducteur (PR) et l'activité XO/NBT des extraits bruts sont fortement corrélés (r=0.49 ; 0.70 et 0.35 à p<0.05 respectivement), comme pour la teneur en CP avec l'intensité lumineuse. L'activité anti-oxydante mesurée par le test

du blanchiment du β-carotène est quant à elle négativement corrélée avec les différents paramètres environnementaux (à part la teneur en carbone inorganique dissous) (r=-0.47 ; -0.38 à p<0.01et -0.22 pour la corrélation avec la température de l'eau, la salinité et les radiations PAR, respectivement).

Tableau IV.5. Variabilité de la teneur en composés phénoliques et de leurs activités chez *Sargassum muticum*. Les variables sont étudiées par sites, par pays (le facteur site étant imbriqué dans le facteur pays) et en fonction des paramètres environnementaux tels que la salinité, la température de l'eau, l'intensité lumineuse ou encore la teneur en carbone inorganique. Le test *a posteriori* de Tukey a été effectué lorsque l'analyse de covariance à deux facteurs (ANCOVA) montrait des différences significatives.

Variable	Test satistique		Facteurs fixes			Co-variables			
			Pays	Site	Pays*Site	CI dissous	Température	Salinité	PAR
Composés Phénoliques	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
Algue		F	13.304	58.581	42.536	0.352	4.105	0.007	2.293
		p	*p<0.001*	*p<0.001*	*p<0.001*	0.558	0.053	0.934	0.142
Composés Phénoliques	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
Fraction		F	2.719	14.144	19.261	0.664	2.557	0.003	1.038
		p	0.051	*p<0.001*	*p<0.001*	0.423	0.122	0.954	0.318
DPPH	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	20.720	43.717	207.18	0.507	1.482	0.002	1.651
		p	*p<0.001*	*p<0.001*	*p<0.001*	0.483	0.234	0.965	0.210
Beta carotène	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	0.501	68.683	58.247	0.069	0.041	2.521	0.238
		p	0.735	*p<0.001*	*p<0.001*	0.796	0.842	0.124	0.630
Pouvoir réducteur	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	3.849	15.118	137.900	0.465	0.174	0.979	0.181
		p	0.014	*p<0.001*	*p<0.001*	0.501	0.680	0.332	0.674
NBT	Two-Way ANCOVA	df	4	2	8	1	1	1	1
		F	106.763	57.632	114.619	3.801	0.235	0.029	0.032
		p	*p<0.001*	*p<0.001*	*p<0.001*	0.062	0.632	0.866	0.859

Tableau IV.6. Coefficient de corrélation de Pearson (coefficient r) entre les paramètres environnementaux et la composition en composés phénoliques chez *Sargassum muticum*. Lorsque les résultats étaient significatifs à p<0.01, ils sont présentés en gras (en rouge lorsque les corrélations étaient négatives et bleu pour les corrélations positives).

				Activités anti-ROS		
	TPC algue	TPC fraction	DPPH	β-carotène	PR	NBT
Carbone inorganique dissous	-0.22	-0.21	-0.17	0.06	-0.23	-0.19
Température de surface de la mer	**0.61**	**0.35** *	0.13	**-0.47**	0.08	0.05
Salinité	**0.48**	0.20	0.09	**-0.38** *	-0.08	0.12
Radiation Disponibles pour la PS (PAR)	**0.73**	**0.74**	**0.49**	-0.22	**0.70**	**0.35** *

PAR, Rayonnement Photosynthétiquement Actif disponible. Un « * » est noté lorsque les corrélations statistiquement significatives à p<0.05 (en gras) ne l'était plus à p<0.01.

IV.3.3.3. Séparation des phlorotannins

Différentes techniques ont été utilisées pour séparer les différents composés phénoliques de *Sargassum muticum* : par leur polarité (purification liquide:liquide) et par leur taille (ultrafiltration, dialyse, tubes à centrifuger, nanofiltration).

a) Purification liquide-liquide

Les TPC varient en fonction de l'étape de purification, et selon l'unité (Poids sec de l'algue ou poids sec dans la fraction) utilisée pour déterminer cette teneur (Figures IV.20 et VI.21).

La figure IV.20 permet de voir l'évolution de la quantité de composés phénoliques lors du procédé de purification. On peut voir que dans tous les cas, une bonne partie des composés aromatiques est perdue durant le procédé de purification. Ainsi, pour la Norvège par exemple, on perd en moyenne 0.9% du poids sec de l'algue durant la purification ce qui représente plus de 50% de la quantité de composés aromatiques initialement présente dans l'algue. La quantité perdue dépend des extraits, mais également du site et du pays d'échantillonnage. On remarque une perte importante après l'étape de précipitation à l'éthanol ce qui suggère une précipitation de CP liés à des protéines et des glucides par exemple, ou à des protéines et des glucides possédant un cycle aromatique dans leur structure. De la même façon, la perte observée après la séparation entre AE et phase aqueuse suggère la présence de composés très polaires restant en phase aqueuse.

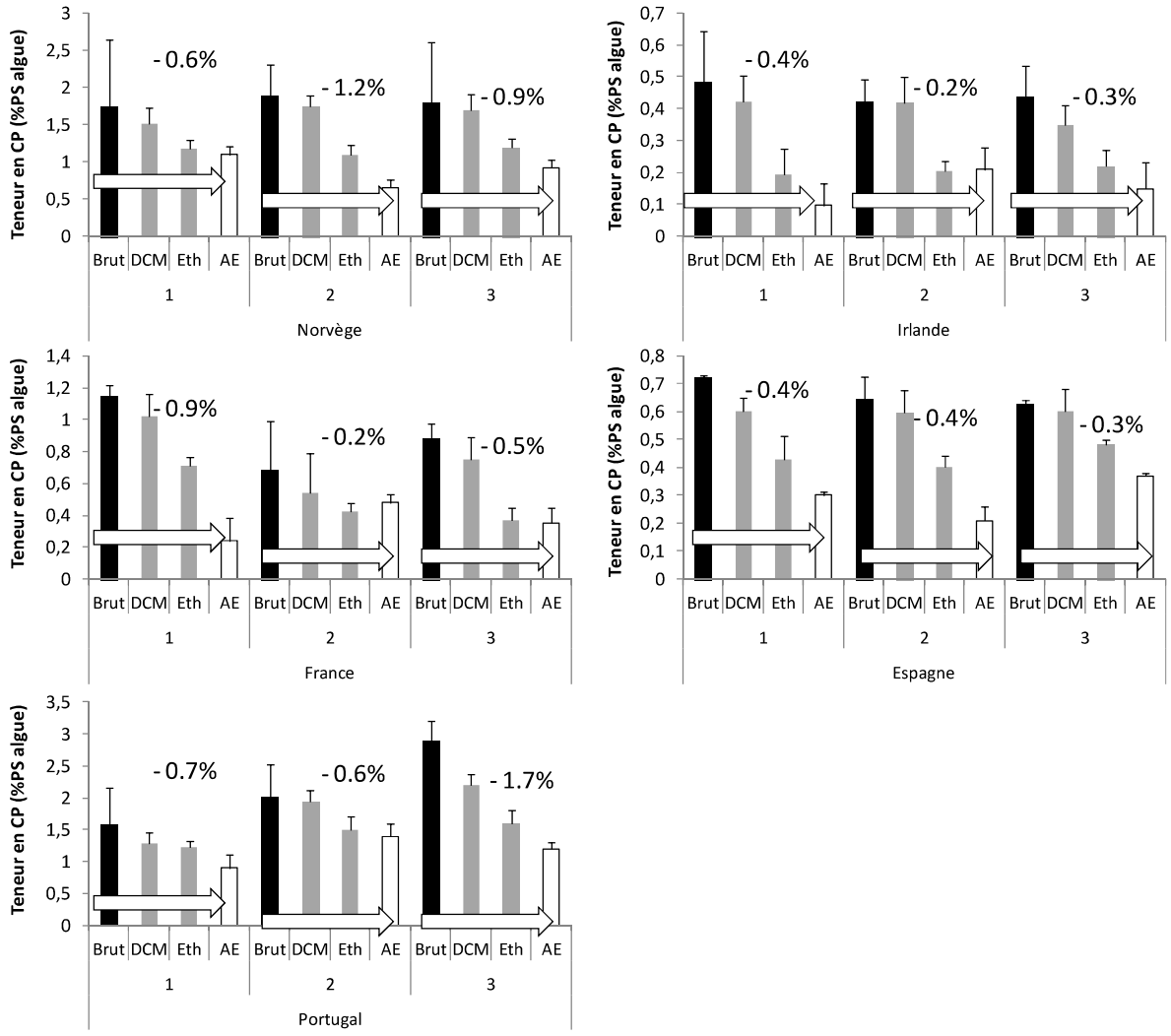


Figure IV.20. Variabilité spatiale de la teneur en composés phénoliques (en fonction du poids sec de l'algue) de *Sargassum muticum* déterminée sur les extraits bruts et purifiés (purification S/L) pour les extraits en fonction du site et du pays d'échantillonnage (Norvège, Irlande, France, Espagne et Portugal). Les flèches blanches indiquent la perte de CP (par rapport à la quantité initialement extraite de l'algue) au cours de la purification lorsqu'une diminution significative était visible. Le pourcentage indiqué correspond à la différence entre la valeur obtenue pour l'extrait purifié et celle de l'extrait brut. DCM, dichlorométhane ; Eth, éthanol ; AE, acétate d'éthyle.

Les fractions issues de la semi-purification S/L ont été enrichies en composés aromatiques (Figure IV.21). Ceux-ci peuvent représenter plus de 15% du poids sec de la fraction la plus riche (cas des fractions AE pour les extraits provenant de la Norvège et du Portugal). Cette procédure de purification L/L ne permet pas d'obtenir des fractions aussi riches que la purification par SPE présentée précédemment (Figure IV.19 et IV.21). Selon les pays, la purification n'apporte pas autant d'améliorations par rapport à l'extrait brut, par exemple, pour la France, la fraction AE n'est pas plus enrichie en CP (Figure IV.21). C'est pour les extraits provenant de Norvège et du Portugal que la purification semble être la plus bénéfique même si, dans le meilleur des cas on ne gagne que 9% du poids sec par rapport à l'extrait de départ (site 2 de la Norvège).

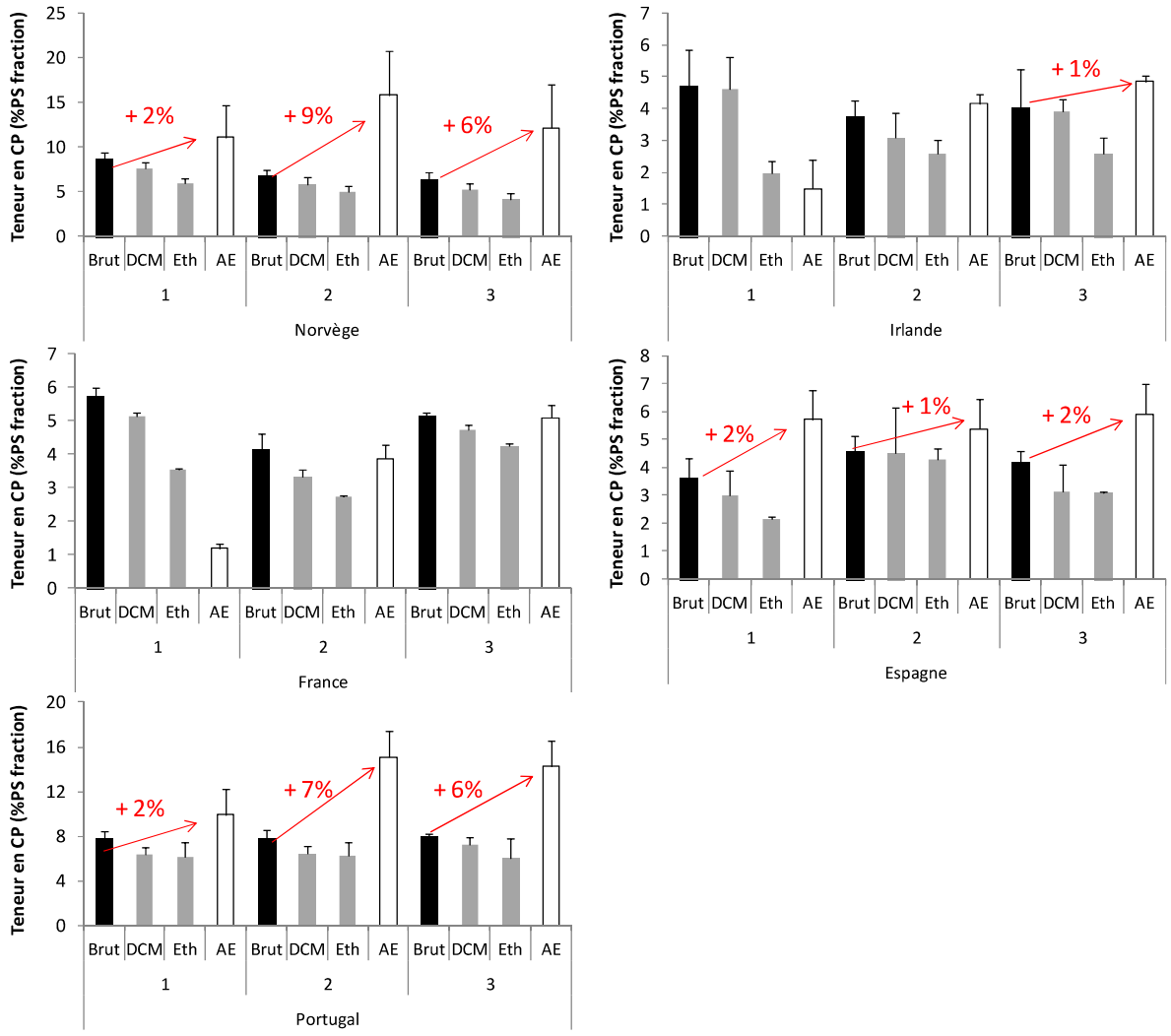


Figure IV.21. Variabilité spatiale de la teneur en composés phénoliques (en fonction du poids sec de la fraction) de *Sargassum muticum* déterminée sur les extraits bruts et purifiés (purification S/L) pour les extraits provenant de Norvège, Irlande, France, Espagne et Portugal. Les flèches rouges indiquent l'enrichissement des fractions en CP au cours de la purification (en pourcentage du poids sec de la fraction) lorsqu'une augmentation significative était visible. Le pourcentage indiqué correspond à la différence entre la valeur obtenue pour l'extrait purifié et celle de l'extrait brut. DCM, dichlorométhane ; Eth, éthanol ; AE, acétate d'éthyle.

Le tableau IV.7 présente les activités des extraits bruts ainsi que de la fraction AE récupérée en fin de semi-purification S/L. Il s'agissait de voir, si la purification, en concentrant les CP permettait d'avoir une augmentation d'activité anti-radicalaire et anti-oxydante dans les fractions. On peut voir ici que, quels que soient le pays et le site considérés, les extraits bruts ne présentent pas d'activités anti-oxydantes ni anti-radicalaire comparables à celles des témoins positifs. En revanche, après purification, les extraits purifiés provenant de tous les pays sauf d'Irlande présentent des activités anti-radicalaires importantes comparables à celles des témoins positifs. Pour ce qui est des activités antioxydantes, seuls quelques extraits purifiés d'Espagne montrent des activités comparables à celles des témoins positifs (en moyenne pour les trois sites : 0.16 ± 0.02 $mg.mL^{-1}$ contre 0,25 ± 0.01 $mg.mL^{-1}$ de moyenne pour les témoins positifs).

Tableau IV.7. Activités anti-radicalaire et anti-oxydantes mesurées avant et après purification des extraits provenant des échantillons de *Sargassum muticum* prélevés le long des côtes atlantiques. Les données sont analysées à l'aide d'une ANOVA à un facteur suivie d'un test *a posteriori* de Tukey (p<0.05). Les fractions les plus actives et comparables aux témoins positifs sont indiquées par les astérisques rouges.

			Moyennes ± ET Tukey HSD (p<0.005)					
Variable	Pays	Fraction	Site 1		Site 2		Site 3	
IC_{50} mg.mL-1	Norvège	EB	0.73 ± 0.03		0.65 ± 0.01		0.67 ± 0.01	
		EP	0.09 ± 0.02	*	0.05 ± 0.01	*	0.04 ± 0.01	*
	Irlande	EB	0.81 ± 0.02		0.96 ± 0.02		0.82 ± 0.02	
		EP	0.18 ± 0.01		0.19 ± 0.01		0.17 ± 0.01	
	France	EB	0.67 ± 0.02		0.68 ± 0.01		0.68 ± 0.01	
		EP	0.06 ± 0.01	*	0.07 ± 0.01	*	0.12 ± 0.01	*
	Espagne	EB	0.86 ± 0.03		0.75 ± 0.02		0.79 ± 0.03	
		EP	0.09 ± 0.01	*	0.10 ± 0.01	*	0.09 ± 0.01	*
	Portugal	EB	1.02 ± 0.03		0.64 ± 0.01		0.52 ± 0.01	
		EP	0.10 ± 0.01	*	0.04 ± 0.01	*	0.02 ± 0.01	*
	Témoins positifs	BHA	0.09 ± 0.01					
		BHT	0.09 ± 0.01					
		Vit C	0.11 ± 0.01					
		Vit E	0.14 ± 0.01					
AAC_{700} mg.mL-1	Norvège	EB	1.26 ± 0.04		1.15 ± 0.05		1.09 ± 0.03	
		EP	0.32 ± 0.01		0.33 ± 0.01		0.39 ± 0.01	
	Irlande	EB	1.51 ± 0.04		1.31 ± 0.03		1.43 ± 0.06	
		EP	0.44 ± 0.01		0.58 ± 0.01		0.51 ± 0.01	
	France	EB	2.01 ± 0.05		2.52 ± 0.09		1.89 ± 0.08	
		EP	0.53 ± 0.01		0.51 ± 0.02		0.57 ± 0.02	
	Espagne	EB	0.84 ± 0.01		0.94 ± 0.01		0.81 ± 0.02	
		EP	0.18 ± 0.01	*	0.16 ± 0.01	*	0.15 ± 0.01	*
	Portugal	EB	1.72 ± 0.06		1.63 ± 0.06		1.93 ± 0.06	
		EP	0.39 ± 0.01		0.25 ± 0.02	*	0.32 ± 0.03	
	Témoins positifs	BHA	0.25 ± 0.01					
		BHT	0.25 ± 0.02					
		Vit C	0.25 ± 0.01					
		Vit E	0.27 ± 0.02					

b) Séparation par taille des phlorotannins

Après avoir comparé les extrait bruts et purifiés (phase organique après lavage à l'acétate d'éthyle) au niveau de leurs activités anti-radicalaires (test DPPH) et anti-oxydantes (test du blanchiment du β-carotène), nous avons choisi de travailler plus précisément sur les extraits les plus riches en CP : c'est-à-dire ceux provenant de la Norvège et du Portugal. Nous voulions savoir (1) quelle était la taille des composés phénoliques produits par la sargasse et (2) si les composés étaient de taille identique d'une extrémité à l'autre du gradient étudié. Nous avons commencé par le site 1 de ces deux pays. Par manque de temps les autres sites de ces deux pays n'ont pas été analysés. Nous avons ainsi testé quatre procédés de séparation par la taille des composés présents dans les différents extraits constitués à partir des échantillons du site 1 de la Norvège et du Portugal. Ces procédés ont été comparés entre eux afin de dégager, quand cela était possible, le protocole le plus efficace pour partitionner et concentrer les composés actifs.

Après séparation, les deux fractions résultantes (rétentat et perméat) ont donc été analysées : la quantité de CP contenus dans les fractions a été mesurée ainsi que les activités anti-radicalaires associées. Les perméats n'ayant pas montré d'activités anti-radicalaires ou antioxydantes, seules les activités des rétentats sont présentées sur les graphiques. Enfin, afin de valider la présence de composés phénoliques dans les perméats et les rétentats des différents extraits passés sur membranes, les différentes fractions obtenues ont été analysées en RMN du proton. Les différentes fractions préalablement lyophilisées sont donc reprises dans du MeOD. Par souci de clarté, seuls les échantillons les plus représentatifs seront présentés.

b.1) Séparation par centrifugation

Pour chacun des seuils de coupures testés, **très peu de composés phénoliques semblent passer au travers de la membrane** (Figure IV.22). Le perméat est en effet constitué au maximum par 14.61 ± 0.22 % de la quantité de CP présents dans l'extrait de départ. Pour les extraits purifiés passés sur les membranes, la quantité de CP présente dans le perméat est même négligeable étant donné qu'elle ne dépasse pas 0.07 ± 0.01% de la quantité de CP avant séparation. On peut donc en déduire que très peu de composés sont de taille inférieure à 30 KDa puisque la quantité de CP retenue est la même quel que soit le seuil de coupure utilisé ici. Par ailleurs, pour les extraits bruts, on remarque tout de même une diminution de la quantité de CP passant dans le perméat quand le seuil de coupure diminue. De plus, le deuxième constat important est la perte de matière assez importante lors du procédé en lui-même. C'est le cas en particulier pour les extraits purifiés du Portugal, la perte de matière dépasse même 81% pour la membrane coupant à 10 KDa. Au niveau des activités anti-radicalaires, celles-ci sont plus importantes dans les extraits issus des algues de Norvège. Cela est particulièrement vrai pour les extraits bruts. Les extraits purifiés perdent en activité par rapport à l'extrait brut durant le procédé (Figure IV.22 et Tableau IV.7). Pour les rétentats provenant des extraits obtenus sur les algues du Portugal, tous ont perdu leurs activités, par rapport à l'extrait brut de départ, après traitement sur membranes (Figure IV.22 et Tableau IV.7).

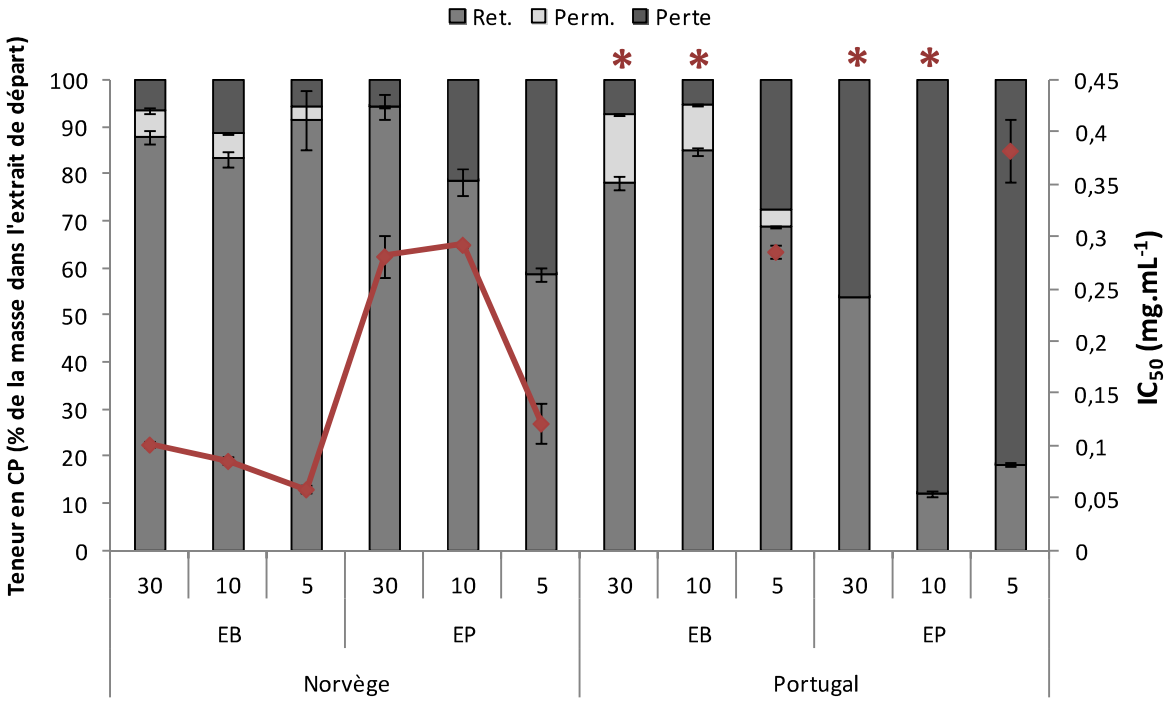


Figure IV.22. Répartition des composés phénoliques de *Sargassum muticum*, dans les fractions issues de la séparation par taille (perméats et rétentats) par les tubes à centrifuger. Les pourcentages sont calculés par rapport à la masse de CP présent dans l'extrait de départ, c'est-à-dire avant séparation. Afin d'avoir une idée de la perte occasionnée par le procédé, la quantité de CP perdue durant la manipulation est également indiquée. L'activité anti-radicalaire des rétentats est présentée sur l'axe secondaire (IC_{50} en $mg.mL^{-1}$).

Les composés aromatiques ne sont pas ou très peu visibles sur les spectres obtenus sur les perméats (non présenté) et ce, quelle que soit la membrane utilisée. Le mannitol est visible dans tous les rétentats excepté ceux des extraits purifiés (Figure IV.23). Comparé à l'extrait de départ, le profil chimique des composés aromatiques présents dans les rétentats ne semble pas varier (Figure IV.23 ; Tanniou *et al.,* 2013b Figure 5 du manuscrit présenté au paragraphe IV.3.3.1).

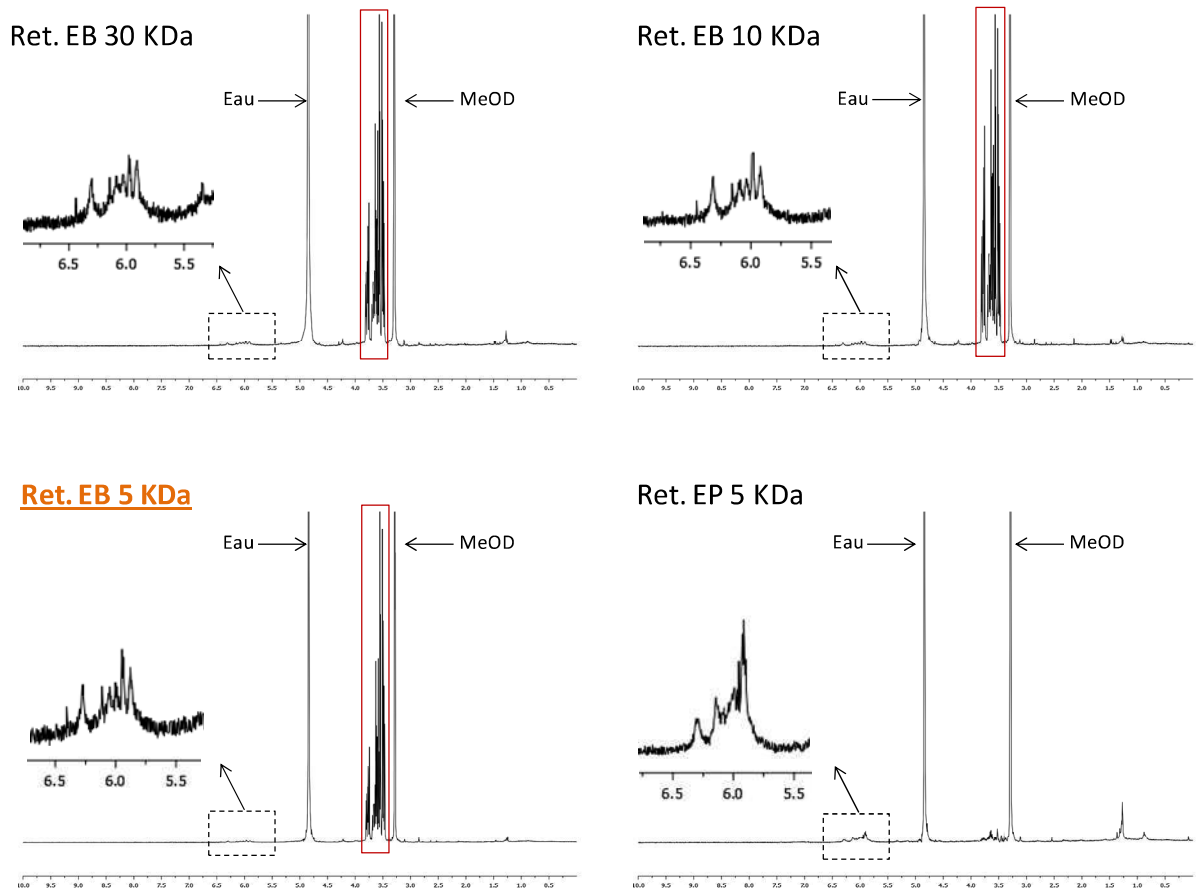


Figure IV.23. Spectres ^{1}H RMN des rétentats obtenus après séparation d'extraits bruts de *Sargassum muticum* provenant du site 1 de Norvège par centrifugation sur des membranes de 5, 10 et 30KDa. Le rétentat de l'extrait provenant de la purification liquide:liquide des extraits du site 1 de Norvège. Les pics caractéristiques du mannitol sont encadrés en rouge. Un agrandissement de la zone des aromatiques entre 5.5 et 6.5 ppm. Les fractions les plus riches en composés phénoliques sont soulignées en orange.

b.2) Séparation par ultrafiltration

Nous faisons le même constat pour le procédé d'ultrafiltration puisque très peu de composés phénoliques se retrouvent dans les perméats et ce, pour chacun des seuils de coupure testés. En revanche les perméats semblent contenir davantage de CP que les perméats obtenus par centrifugation. Le perméat de la cassette coupant à 10 KDa, contient plus de 13% de CP par rapport à la quantité initialement présente dans l'extrait à partitionner (13.0 ± 5.3% et 15.1 ± 6.2 % pour la Norvège et le Portugal, respectivement) (Figure II.24). Les activités antiradicalaires semblent ici augmenter après traitement en ce qui concerne les extraits bruts ; en revanche on observe toujours une perte d'activité pour les extraits purifiés. Ainsi, pour les extraits de la Norvège et du Portugal on passe de 0.73 ± 0.03 et 1.02 ± 0.03 mg.mL^{-1} pour les extraits bruts à 0.19 ± 0.01 et 0.17 ± 0.02 mg.mL^{-1} dans les rétentats après séparation (Figure II.24).

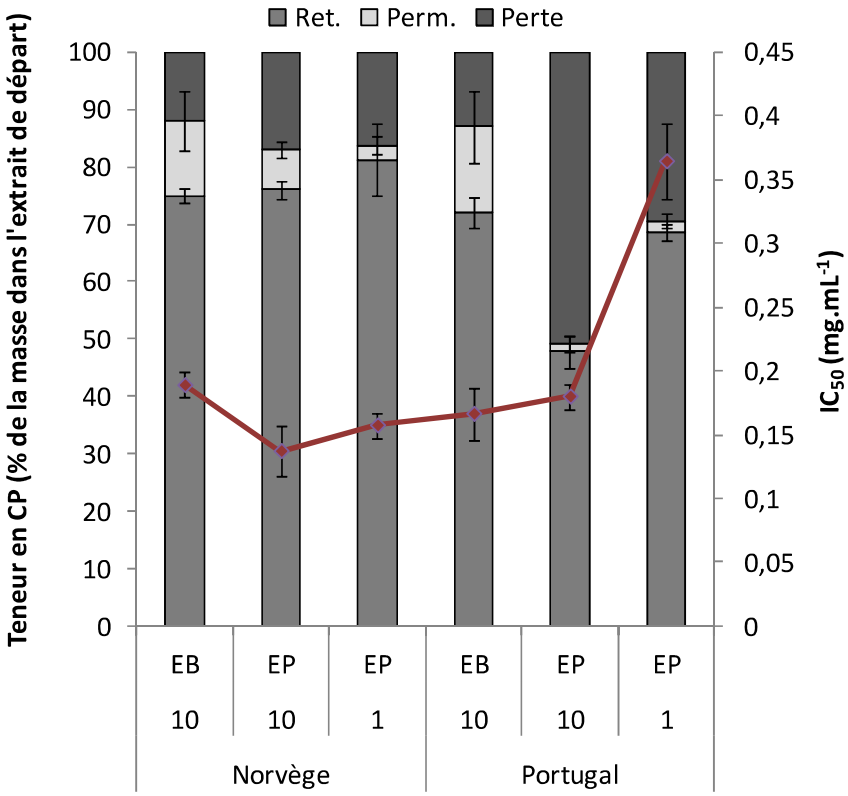


Figure IV.24. Répartition des composés phénoliques de *Sargassum muticum*, dans les fractions issues de la séparation par taille (perméats et rétentats) par ultrafiltration. Les pourcentages sont calculés par rapport à la masse de CP présent dans l'extrait de départ, c. à d. avant séparation. Afin d'avoir une idée de la perte occasionnée par le procédé, la quantité de CP perdue durant la manipulation est également indiquée. L'activité anti-radicalaire des rétentats est présentée sur l'axe secondaire (IC_{50} en $mg.mL^{-1}$).

Les composés aromatiques ne sont pas ou très peu visibles sur les spectres obtenus sur les perméats quelle que soit la membrane utilisée : 1 KDa (non présenté) ou 10 KDa (Figure IV.25). Le mannitol visible autour de 4 ppm est présent dans le rétentat ainsi que dans le perméat pour les deux membranes testées mais seulement pour les extraits bruts, les extraits purifiés ne contenant plus de mannitol. Comparé à l'extrait de départ, le profil chimique des composés aromatiques présents dans les rétentats ne semble pas varier (Figure IV.25 et ; Tanniou *et al.*, 2013b Figure 5 du manuscrit présenté au paragraphe IV.3.3.1).

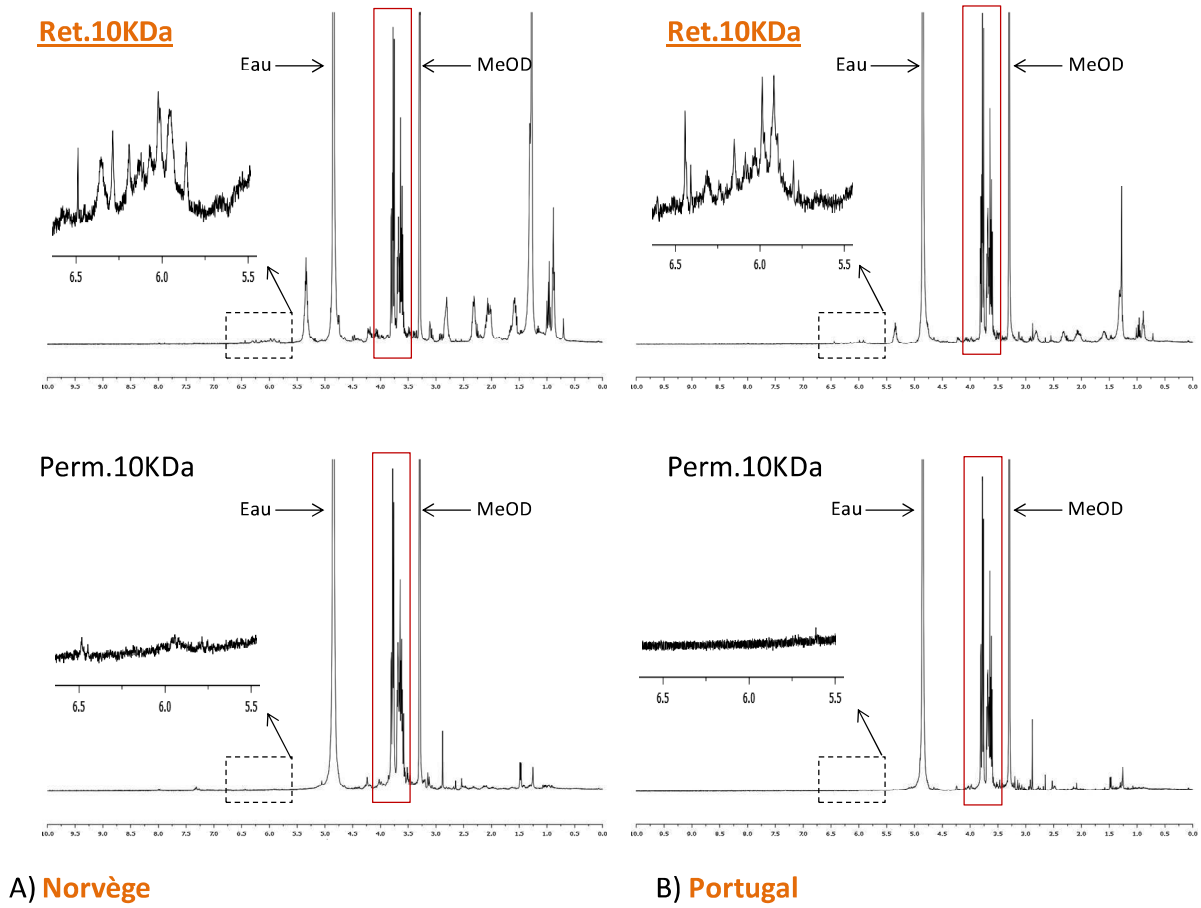


Figure IV.25. Spectres ^{1}H RMN des rétentats et perméats obtenus après séparation d'extraits brut de *Sargassum muticum* provenant de A) Norvège (à droite) ou B) du Portugal (à gauche) par ultrafiltration sur une membrane de 10KDa. Les pics caractéristiques du mannitol sont encadrés en rouge. Un agrandissement de la zone des aromatiques entre 5.5 et 6.5 ppm. Les fractions les plus riches en composés phénoliques sont soulignées en orange.

b.3) Séparation par dialyse

Comme pour les deux autres procédés, très peu de composés passent au travers de la membrane, suggérant encore la présence de composés de grande taille ou au moins supérieure à 12 KDa. Quelques composés phénoliques sont tout même présents dans les perméats des différents boudins de dialyse (très peu pour la membrane la plus petite : 0.5 KDa) (Figure II.26). Par ailleurs, on observe une très grande perte de composés au cours de la séparation par dialyse. En effet, pour les extraits de Norvège par exemple, la perte observée dépasse les 49%. En revanche, il semblerait que ce procédé permette de très bien conserver l'activité anti-radicalaire des composés phénoliques. A part pour la membrane 0.5 KDa, les activités sont quasiment toutes augmentées dans les rétentats des différentes membranes. Pour les extraits bruts de la Norvège par exemple on obtient des activités même supérieures à celles que l'on obtient après purification S/L ou sur colonne SPE (IC_{50} de 0.03 ± 0.01 ; 0.09 ± 0.02 et 0.51 ± 0.03 mg.mL^{-1} pour le rétentat de la membrane 12KDa, l'extrait issu de la purification S/L et SPE respectivement) (Figure II.26).

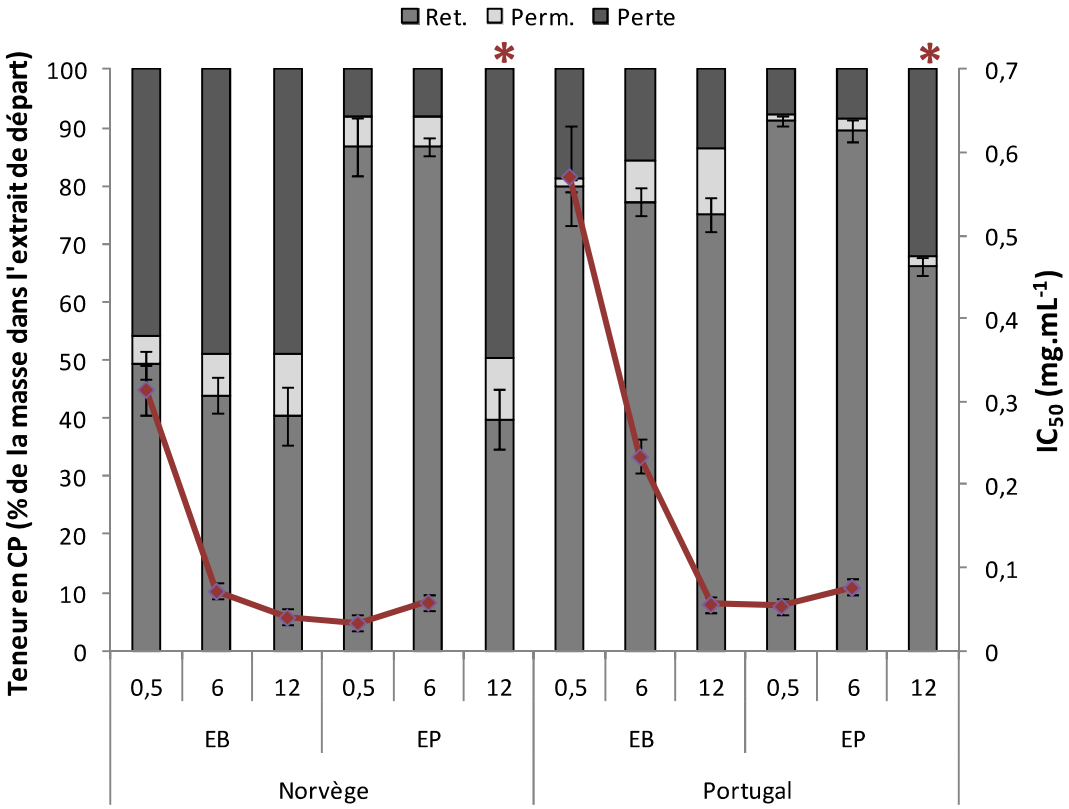


Figure IV.26. Répartition des composés phénoliques de *Sargassum muticum* dans les fractions issues de la séparation par taille (perméats et rétentats) par dialyse. Les pourcentages sont calculés par rapport à la masse de CP présent dans l'extrait de départ, c. à d. avant séparation. Afin d'avoir une idée de la perte occasionnée par le procédé, la quantité de CP perdue durant la manipulation est également indiquée. L'activité anti-radicalaire des rétentats est présentée sur l'axe secondaire (IC_{50} en $mg.mL^{-1}$).

Les composés aromatiques ne sont pas ou très peu visibles sur les spectres obtenus sur les perméats et ce, quelle que soit la membrane (non présenté ici). Le **mannitol** n'est visible que sur les spectres RMN correspondant au rétentat de la membrane de 0.5 KDa et **aux perméats des membranes 6 et 12 KDa** pour les extraits provenant des deux pays testés (Figure IV.27) et uniquement sur extraits bruts, les extraits purifiés ne contenant déjà pas/peu de mannitol. Comparé à l'extrait de départ, le profil chimique des composés aromatiques présents dans les rétentats ne semble pas varier (Figure IV.27 et ; Tanniou *et al.*, 2013b Figure 5 du manuscrit présenté au paragraphe IV.3.3.1).

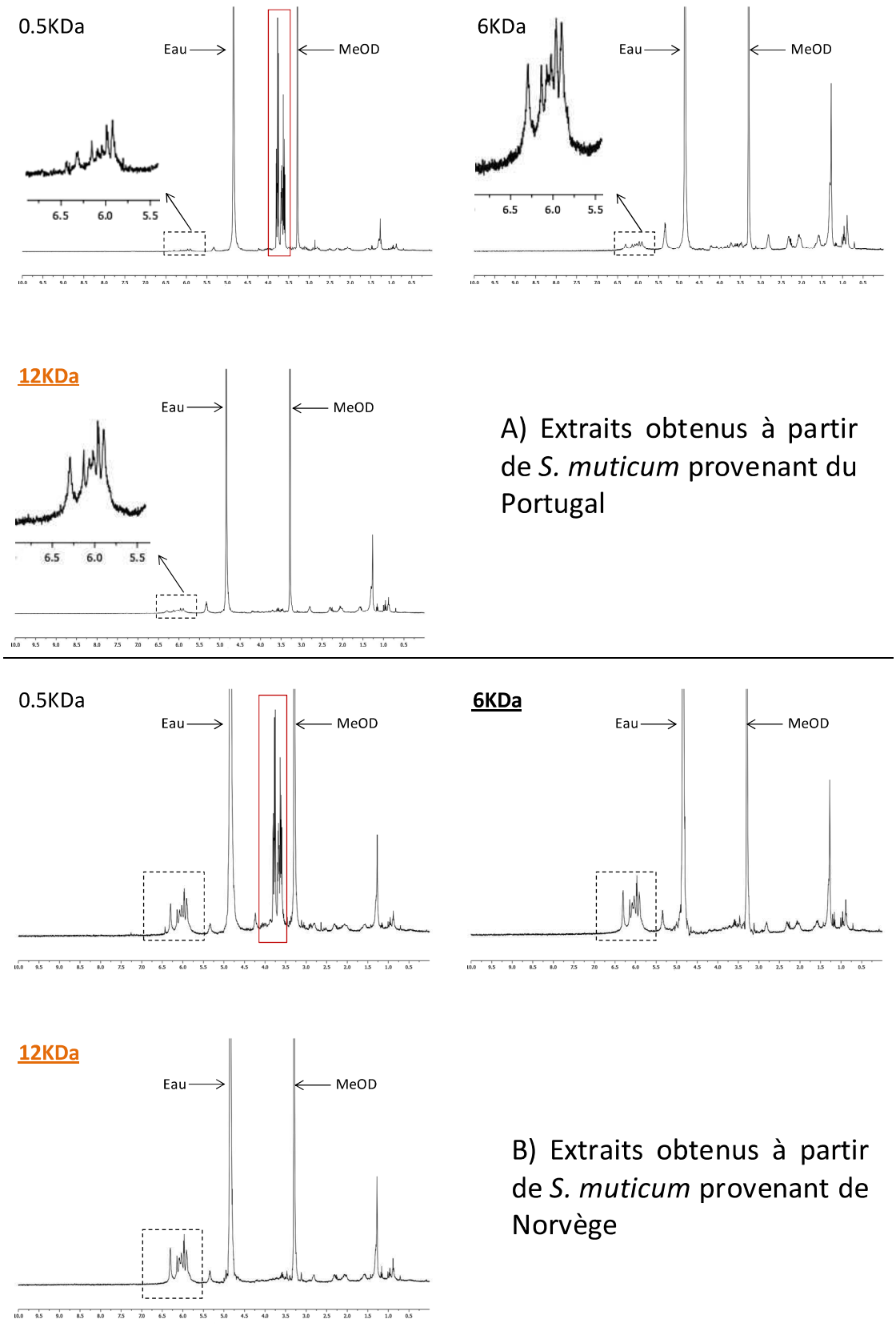


Figure IV.27. Spectres ^{1}H RMN des rétentats obtenus après séparation d'extraits bruts de *Sargassum muticum* provenant du site 1 du Portugal (A, partie haute) ou de la Norvège (B, partie basse) par dialyse sur des membranes de 0.5, 6 et 10KDa. Les pics caractéristiques du mannitol sont encadrés en rouge. Un agrandissement de la zone des aromatiques entre 5.5 et 6.5 ppm. Les fractions les plus riches en composés phénoliques sont soulignées en orange.

b.4) Séparation par nanofiltration

La nanofiltration (NF) n'a pas permis d'obtenir un rétentat actif, les résultats ne sont donc pas présentés ici. Beaucoup de composés sont perdus lors du procédé en lui-même (plus de 50% ; données non présentées). Il est probable que les étapes de congélation/décongélation des extraits bruts et des fractions obtenues (nécessaires à cause de l'éloignement du pilote de NF) ont eu des effets néfastes sur les CP, plus que le procédé lui-même. Une étude de la NF dans de meilleures conditions aurait sans doute permis d'arriver à d'autres conclusions.

Pour ce système, comme pour les autres procédés de séparation, on peut voir sur les spectres RMN obtenus que les CP restent dans le rétentat (Figure IV.28). D'autre part, on constate que le perméat ne contient pas de mannitol, ce qui pourrait être intéressant pour purifier les CP de bas poids moléculaire.

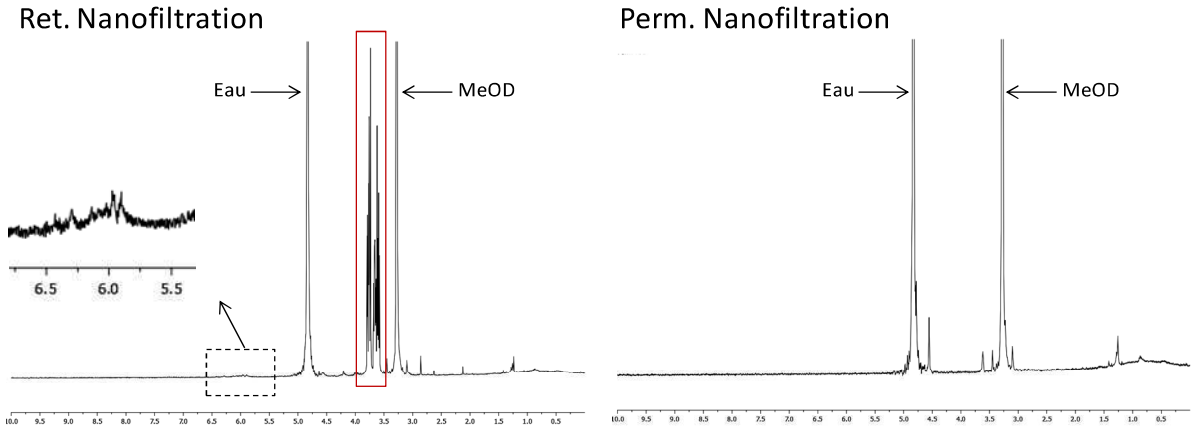


Figure IV.28. Spectres ^{1}H RMN du rétentat et du perméat obtenus après séparation d'extraits brut de *Sargassum muticum* provenant du site 1 de Norvège par nanofiltration. Les pics caractéristiques du Mannitol sont encadrés en rouge. Un agrandissement de la zone des aromatiques entre 5.5 et 6.5 ppm.

c) Comparaison des différents procédés

Afin de comparer les différents procédés de séparation par la taille des composés phénoliques, nous avons calculé un score pour chaque procédé (Tableau IV.8).

Les teneurs en composés phénoliques dans les rétentats obtenus à partir des extraits bruts sont, pour tous les procédés testés, supérieures pour les extraits obtenus à partir des algues du Portugal par rapport à ceux obtenus à partir des algues de Norvège. Le procédé de centrifugation permet de concentrer au mieux les polyphénols (32.23 et 73.64 TTP%MS dans la fraction de l'extrait brut respectivement pour la Norvège et du Portugal). Les teneurs les plus faibles en composés phénoliques dans les rétentats sont observées lors de l'utilisation du procédé d'ultrafiltration (2.12 et 20.87 TTP%MS dans la fraction).

Tableau IV. 8. Comparaison des différentes techniques de séparations et quantité de composés phénoliques de *Sargassum muticum*, en pourcentage de la matière sèche pour les rétentats de l'extrait brut de la Norvège et du Portugal du site1. ET : écart-type. Suite à une ANOVA significative ($p<0.05$), les différences entre les fractions sont représentées par différentes lettres et chiffres.

	Ultrafiltration		Dialyse		Tube à centrifuger		Nanofiltration
	10KDa	1KDa	6KDa	0.5KDa	10KDa	5KDa	
Volume (mL)	200 (2)	200 (2)	5 (3)	5 (3)	10 (3)	10 (3)	2000 (1)
Durée (heures)	4 (2)	16 (3)	30 (3)	30 (3)	1,5 (1)	3 (2)	0,5 (1)
Coût /1 pièce (€)	387 (2)	315 (2)	5,1 (1)	18,72 (1)	7,96 (1)	7,96 (1)	x (3)
TPP (%MS) fraction Norvège	2.12 (3)	-	1.22 (3)	3.53 (3)	32.23 (1)	12.84 (2)	17.74 (2)
TPP (%MS) fraction Portugal	20.87 (1)	-	43.79 (1)	15.22 (2)	73.52 (1)	11.64 (2)	18.80 (2)
Score Norvège	9	-	10	10	6	8	7
Score Portugal	7	-	8	9	6	8	7

IV.3.4.Discussion

IV.3.4.1. Variabilité des teneurs et activités des composés phénoliques dans les extraits bruts de *Sargassum muticum* en Europe

Cette étude examinait l'effet du pays et du site d'échantillonnage sur la teneur en CP et les activités antioxydantes et antibactériennes dans les extraits bruts de *S. muticum*. La procédure de criblage nous a permis d'identifier les extraits les plus prometteurs pour des applications futures et également de savoir si l'exploitation de cette espèce était envisageable dans les pays étudiés.

À la période d'échantillonnage choisie, d'intéressantes activités antibactériennes, antioxydantes et anti-ROS ont été mesurées sur les extraits bruts. L'étude de ces extraits fait également ressortir des activités réductrices et anti-XO supérieures à celles mesurées pour les témoins positifs utilisés dans l'industrie (BHA, BHT par exemple). Les extraits les plus actifs sont ceux provenant des extrémités du gradient, c'est-à-dire provenant de Norvège et du Portugal. Ces extraits présentent également une concentration en CP importante (supérieure à 2% ou 4%MS algue pour la Norvège et le Portugal, respectivement) ce qui démontre encore le rôle des CP dans les activités détectées. Cependant, les extraits provenant de France possèdent également des activités anti-radicalaires importantes (0.76 ± 0.01 $mg.mL^{-1}$) toujours en relation avec une teneur en CP assez importante (un peu plus de 1% de la MS). Dans notre étude, seule une faible quantité de CP a été extraite des algues comparé à ce que l'on peut voir dans d'autre travaux où la teneur en CP peut dépasser 6% de la MS pour la même espèce (Connan *et al*., 2004; Plouguerné *et al*., 2006; Parys *et al*., 2009). Cela peut s'expliquer par la période d'échantillonnage choisie. En effet, on sait depuis longtemps que la quantité de CP contenue dans les algues est largement dépendante de la saison et des conditions environnementales en général (Jormalainen et Honkanen, 2001; Hemmi et Jormalainen, 2004; Fairhead *et al.*, 2005; Connan *et al*., 2007). Ici, la période d'échantillonnage a été choisie afin d'échantillonner des individus de *Sargassum muticum* dans le même état physiologique le long du gradient européen étudié. Cette approche a semblé

être la plus appropriée afin de pouvoir comparer les résultats obtenus dans les différents pays en évitant les biais produit par la reproduction ; aussi seuls des individus immatures ont été récoltés. Cependant, cette période n'est pas connue pour être la plus propice à la production de CP habituellement maximum au début de l'été (Connan *et al*., 2004; Plouguerné *et al.*, 2006; Le Lann *et al.*, 2012a). De plus, les extraits brut obtenus inhibent la croissance de 5 souches bactériennes à plus de 50% et possèdent des activités équivalentes à celle de l'antibiotique Chloramphenicol à la même concentration (50 $\mu g.mL^{-1}$) (*cf.* Tableau 3 dans Tanniou *et al*., 2013b : manuscrit présenté au paragraphe IV.3.3.1).

Le tableau IV.9 résume les différentes activités anti-bactériennes mesurées sur les extraits bruts provenant des différents Pays échantillonnés ainsi que ceux obtenus en annexe n°4 (détection de *Vibrio tapetis* et *V. harveyi* à la surface des thalles de *Sargassum muticum*). Ainsi, on peut voir que *Sargassum muticum* produit des molécules capables d'inhiber a croissance de toutes les souches testées, terrestres et marines. Les composés extraits pourraient donc être utilisés en aquaculture pour protéger les élevages de certaines bactéries comme les *Vibrio* ou en médecine humaine contre des pathogènes pouvant s'avérer dangereux dans certains cas tels que *E. coli*, *P. aeruginosa* ou encore *S. aureus*. Les composés produits par *S. muticum* n'ont cependant pas les mêmes propriétés anti-bactériennes selon les pays où l'algue a été récoltée. Les extraits bruts provenant des algues françaises semblent uniquement inhiber la croissance de *P. aeruginosa* alors que les extraits provenant des algues prélevées en Norvège, Irlande et au Portugal sont efficaces contre quasiment toutes les souches testées. *Sargassum muticum* semblant produire des composés aux actions antibactériennes efficaces il serait intéressant de tester nos extraits sur une grande quantité de bactéries en utilisant le protocole décrit au point IV.3.

Tableau IV. 9. Résumé des activités anti-bactériennes mesurées sur les extraits brut contre les différentes bactéries testées marines (en bleu) ou terrestre (en rouge). Les hôtes les plus courants de chacune des espèces sont également présentés.

Extraits testés sur les bactéries :	Hôtes les plus courant	Propriété anti-bactérienne de *S. muticum*	Extraits bruts efficaces
Staphylococcus aureus	Pathogène pour les **êtres humains** pouvant provoquer des symptômes graves à mortels dans certains cas	oui	I
Escherichia coli		oui	N,E,P
Pseudomonas aeruginosa		oui	N,I,F,E,P
Vibrio aestuarianus	**Huître creuse** (*Crassostrea gigas)*	oui	N,I,P
Vibrio anguillarum	Poissons d'élevage tels que le **Saumon** (*Salmo salar*) et la **Brème commune** (*Abramis brama*)	oui	N,I,P
Vibrio parahaemolyticus	**Animaux filtreurs** d'élevage (coquillages et poissons), pathogène chez l'**homme** également	oui	I
Vibrio harveyi	Pathogène de certains **poissons** (Turbots), **crustacés** (homard, langoustes) et **coquillages** (huîtres)d'élevage	oui *	*n.t.*
Vibrio tapetis	Pathogène des **palourdes** (*Venerupis decussata*)	oui *	*n.t.*

n.t., non testé ; « * », Détection de la présence de *Vibrio harveyi* et *V. tapetis* sur les thalles de *Sargassum muticum* par amplification d'ADN ; « N, I, F, E et P » pour Norvège, Irlande, France, Espagne, Portugal.

La Norvège et le Portugal sont les deux pays où l'on retrouve des algues contenant des composés actifs en grande quantité. On peut d'ores et déjà faire l'hypothèse que les conditions environnementales extrêmes régnant aux deux extrémités des côtes atlantiques pourraient entrainer un stress important chez *Sargassum muticum* et ainsi la forcer à produire d'avantage de composés de défense contre les radiations UV et les changements de température par exemple. L'étude plus détaillée de la variation de cette teneur en CP en fonction des paramètres environnementaux est présentée au paragraphe IV.3.4.3.

IV.3.4.2. Purification SPE des extraits bruts obtenus

La distribution des composés phénoliques au sein du pool semble être identique entre les pays en tout cas du point de vue de leur polarité. En effet après semi-purification sur colonne SPE, la majorité des composés se retrouvent dans les fractions plutôt polaires voire légèrement apolaires, comme les fractions aqueuses, hydrométhanoliques ou méthanoliques. Cette distribution change en proportion suivant les échantillons, ce qui semble indiquer que les extraits sont bien composés de différents phlorotannins ; nous sommes donc en présence d'un pool de composés n'ayant pas tous la même polarité selon leur conformation ou leurs liaisons avec d'autres composés. Nous avions déjà montré au chapitre 1, pour *Sargassum muticum*, que le pool de composés phénoliques pouvait varier suivant différents paramètres (Tanniou *et al*., 2013b). Le système SPE a été testé ici dans un but de semi-purification afin de séparer les molécules contenues dans l'extrait et ainsi obtenir une fraction nettoyée où seraient concentrés les composés d'intérêt, ici les CP. On peut cependant noter que les activités antiradicalaires augmentent dans les fractions purifiées par rapport à l'extrait brut de départ montrant bien là encore le rôle des CP dans les activités détectées. Ces activités sont comparables à celles obtenues pour les témoins positifs qui sont des molécules actives utilisées dans l'industrie. Aucune activité anti-oxydante n'est mesurée sur les extraits riches en CPs après purification. Le test du blanchiment du β-carotène mesure en effet plutôt l'activité des molécules lipophiles (Koleva *et al*., 2002; Le Lann *et al*., 2008) or les composés actifs ici sont plutôt polaires voire légèrement apolaires.

Cette étude a également mis en avant des activités anti-bactériennes très intéressantes des extraits bruts et semi-purifiés obtenus. Les extraits provenant des cinq pays ont ainsi montré une nette activité inhibitrice envers la croissance de bactéries marines (*Vibrio aestuarianus*, *V. anguillarum* and *V. parahaemolyticus*) et terrestres *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*). Les extraits les plus actifs ne sont plus ceux des extrémités du gradient cette fois-ci. En effet, en ce qui concerne les extraits bruts, ce sont ceux provenant d'Irlande ou du Portugal qui sont les plus actifs. Pour les extraits purifiés, seuls ceux contenant une grande quantité de CP et ayant des activités anti-ROS importantes ont un pouvoir antibactérien significatif. Cependant, les extraits semblent moins actifs après purification ce qui suggère que les composés actifs contre les bactéries ne sont pas que les composés phénoliques. Des études préliminaires avaient déjà décrit des activités anti bactériennes chez *Sargassum muticum* (Hellio *et al*., 2002, 2004a,b). Toujours chez le genre *Sargassum*, d'autres auteurs ont démontré l'activité anti-bactérienne d'extraits chloroformiques (Sastry et Rao, 1994). Plougerné *et al.* (2008, 2010a,b) et Bazes *et al.* (2008)

ont montré ainsi que les extraits les plus actifs pour *Sargassum muticum* étaient plutôt apolaires. Ici, les extraits non polaires n'ont pas été testés. Le but étant ici de savoir si les fractions contenant les CP avaient également des activités anti-bactériennes. On peut donc imaginer que les extraits apolaires récupérés dans les phases MeOH-DCM et DCM à l'issue de la purification SPE seraient plus actifs encore que les extraits polaires. Dans la littérature, des études montrent que certains CP isolés de *Sargassum vestitum et S. natans* présentent des activités anti-fouling (Sieburth et Conover, 1965; Jennings et Steinberg, 1997). Nos résultats ont montré que seuls quelques extraits gardaient leurs activités après purification. Cas de l'extrait provenant du site 1 du Portugal testé contre *V. aestuarianus* et *E. coli*, par exemple.

IV.3.4.3. Relation entre paramètres environnementaux et teneur en composés phénoliques en Europe

En tenant compte de nos résultats, la Norvège et le Portugal apparaissent comme les pays où les composés phénoliques actifs présents chez les algues sont obtenus en grande quantité après séparation. On peut donc émettre l'hypothèse que les conditions environnementales « extrêmes » aux deux extrémités du gradient entraînent un stress chez *Sargassum muticum* la forçant ainsi à produire davantage de composés de défenses comme des CP afin de lutter contre les dommages causés par les radiations UV, ou les changements de température de l'eau par exemple. Ainsi, en tenant compte des tendances observées durant cette étude des paramètres environnementaux, on peut proposer plusieurs hypothèses concernant les facteurs pouvant influer sur la teneur en CP. Durant la période d'échantillonnage choisie, nous avons noté que la quantité de radiation disponible pour la photosynthèse (PAR) était plus grande là où l'on retrouvait le plus de CP, c'est-à-dire aux extrémités du gradient et en France. D'autres auteurs ont d'ailleurs observé un effet significatif de la saison et du niveau d'éclairement (Connan *et al.,* 2004; Plouguerné *et al*., 2006) sur la production de CP en tant que molécules photoprotectrices (de la Coba *et al*., 2009). D'autres paramètres semblant moins corrélés avec les variations observées, comme la salinité par exemple, ont également été cités par d'autres auteurs comme facteur pouvant réduire la quantité de CP produit par les algues (Ragan et Glombitza, 1986; Connan et Stengel, 2011). Cependant, ici, la salinité n'est pas corrélée avec une teneur plus faible en CP, au contraire. La plus faible quantité de CP est retrouvée dans les échantillons d'Espagne par exemple alors que la salinité y est la plus importante (37 psu en moyenne). Nous avons également mis en avant un effet probable de la température de l'eau. Cette donnée paraît tout de même à considérer avec précaution étant donné que l'échantillonnage a eu lieu dans des mares (à part en Norvège), où la température de l'eau est nettement plus dépendante de l'ensoleillement que de la température de l'eau en pleine mer. Nous avons tout de même observé une légère corrélation entre l'augmentation de la température et l'augmentation de la quantité de CP. Ce résultat ne semble pas en accord avec ceux obtenus par d'autres auteurs montrant au contraire un effet néfaste de la température sur les CP (Phillips et Towers, 1982). Les composés phénoliques sont souvent retrouvés en moins grande quantité dans les thalles du fait de leur exsudation dans le milieu en réponse aux fortes températures (Phillips et Towers, 1982). Il aurait été intéressant d'avoir une idée de la quantité exacte de nutriments disponibles au moment de l'échantillonnage dans les différents pays échantillonnés, celle-ci

étant connue pour entrainer des variations sur les teneurs en composés phénoliques chez les algues (Pavia et Toth, 2000 ; Arnold *et al*., 1995 ; Koivikko, 2005). La mesure de la teneur en carbone inorganique dissous n'a pas permis de statuer quant à un effet significatif de celle-ci sur la teneur en composés phénoliques.

Les dates de colonisation de *Sargassum muticum* doivent également être prises en considération. En effet, cette espèce s'est répandue du Nord au Sud de l'Europe à partir de l'Angleterre en 1973. Elle a été repérée récemment au Nord du Portugal (entre 2002 et 2010) et en Norvège dans les années 2000. Il est possible qu'à leur arrivée dans une nouvelle aire de répartition les individus produisent davantage de composés de défenses afin de coloniser efficacement le milieu et de s'adapter aux nouvelles conditions environnementales. Dans tous les cas ; il parait hâtif de tirer des conclusions générales sur l'effet des paramètres environnementaux sur la production de CP par *Sargassum muticum*, en effet de nombreux auteurs ont démontré l'existence de sources de variation à plus petite échelle, telles que les variations jour/nuit ou encore des variations saisonnières (Connan *et al*., 2004; Plouguerné *et al*., 2006 ; Connan *et al*., 2007). De récents travaux, en cours, montrent que l'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des CPs pouvait survenir seulement quelques heures après un stress lumineux par exemple (E. Creis, travaux de thèse en cours). Il serait donc nécessaire de refaire cette étude l'année suivante, à une autre période de l'année ou encore d'effectuer plusieurs échantillonnages par jour, afin d'identifier les sources exactes de variations du contenu phénolique et d'avoir des données plus précises sur l'échelle temporelle de la réponse engendrée.

Par ailleurs, à notre connaissance, les variations spatiales du contenu phénolique ont été examinées à différentes échelles (Van Alstyne *et al*., 1999b) : échelles régionales (10 à 100 Km) à de très larges échelles, comme des différences entre hémisphères (Steinberg, 1989; 1992; Steinberg *et al*., 1995) ou encore entre zones tropicales et tempérées (Steinberg, 1986; Van Alstyne et Paul, 1990; Targett *et al*., 1992; Le Lann, 2009). Ces variations ont été étudiées chez de nombreuses espèces d'algues brunes en Australasie (Steinberg, 1989), dans les Caraïbes, dans l'Atlantique et dans l'Océan Pacifique (Van Alstyne *et al*., 1999b ; Stiger *et al*., 2004). Parmi les études existant sur les algues brunes, *Sargassum* est un modèle souvent utilisé pour démontrer la variabilité de son contenu phénolique (Stiger *et al*., 2004 ; Plouguerné *et al.,* 2006; Zubia *et al*., 2007 ; Le Lann *et al.* 2011, 2012). En Europe le même type d'étude a également été réalisé sur *Ascophyllum nodosum*. D'autres études présentent en plus les variations entre sites au sein d'un même pays (Steinberg, 1989; Targett *et al*., 1992, 1995). Mais à notre connaissance aucune étude ne s'est intéressée à la fois à la variabilité spatiale en termes de quantité et de qualité des composés phénoliques produits à une si grande échelle (façade atlantique). De ce fait cette étude nous permet pour la première fois d'avoir une idée de la variabilité de ce type de composés produits par une seule espèce sur une large zone géographique. Elle vient compléter l'étude précédente sur la variabilité des différentes macromolécules composant la Sargasse (protéines, lipides et glucides, Tanniou *et al*., 2014 en révision).

IV.3.4.4. Purification Liquide-liquide des extraits (avant leur séparation ultérieure par la taille)

La purification liquide-liquide a un effet limité sur la purification des molécules recherchées, ici les composés phénoliques. Même si les teneurs en polyphénols des fractions purifiées de Norvège, d'Espagne et du Portugal, obtenues après extraction liquide:liquide à l'acétate d'éthyle, sont supérieures à celles mesurées dans les extraits bruts de départ, cette technique ne permet pas d'obtenir des fractions aussi concentrées en CP que d'autres procédés de purification tel que le protocole sur colonne SPE testé également dans cette étude. Pour ces trois pays, le protocole permet tout de même de concentrer deux fois la quantité de CP présents dans les fractions. De plus les activités antiradicalaires augmentent significativement dans les extraits purifiés par rapport à l'extrait brut, rendant leurs activités égales ou supérieures à celles des témoins positifs. Les lavages successifs avec des solvants de polarités différentes, jusqu'au lavage à l'acétate d'éthyle ont donc tout de même permis de concentrer les composés phénoliques. Pour l'Irlande et la France, le protocole n'apporte rien en terme de concentration des phénoliques dans la fraction obtenue à l'issue de la purification. Les différences d'efficacité du protocole observées entre les pays signifie que les composés phénoliques chez *Sargassum muticum* n'ont pas tous la même polarité et ils varient selon les pays (Tanniou *et al*., 2013b). Toutefois, nous remarquons que pour tous les pays la quantité de phlorotannins baisse de manière non négligeable au cours du procédé de purification. En effet, dès le 1er lavage et à chacune des étapes suivantes la quantité de CP (%MS de l'algue) diminue par rapport à la quantité initialement présente dans l'extrait brut. Ceci indique qu'une partie des composés phénoliques serait de nature assez apolaire ou liée à des composés très apolaires (lipides de la paroi). Par ailleurs on remarque également une perte de CP après précipitation à l'éthanol suggérant une liaison de certains CP avec certains sucres ou protéines du mélange. Ce protocole pourtant efficace pour l'obtention de fractions purifiées chez d'autres espèces d'algues brunes (Jégou, 2012) ne semble ici pas le mieux adapté à notre modèle. Nous retiendrons tout de même qu'il est moyennement efficace pour les extraits provenant de Norvège et Portugal, la purification ayant en effet permis de concentrer les composés phénoliques mais aussi d'éliminer une grande partie du mannitol (entre 3.6 et 3.9 ppm) présent dans les extraits bruts, et quelques autres molécules (entre 1.5 et 3.0 ppm) qui ne sont plus visibles sur les spectres ^{1}H RMN.

IV.3.4.5. Séparation par la taille des composés phénoliques semi-purifiés

Les essais réalisés sur les différents procédés de séparation ont permis de mettre en évidence que selon le type d'extrait (brut ou purifié), les membranes n'étaient pas aussi efficaces.

a) Avantages des procédés testés

De tous les procédés testés, **la dialyse est le procédé permettant de préserver au mieux l'activité des composés extraits**, les autres procédés entraînant généralement une

diminution drastique des activités par rapport à celles mesurées dans l'extrait de départ. Pourtant, cela ne semble pas lié à la durée du procédé ; la dialyse étant l'un des procédés les plus longs (environ 30 heures). La perte d'activité liée aux autres procédés utilisés pourrait être due à l'absence de précaution suffisante quant à l'exposition à la lumière des échantillons. Certains auteurs ayant en effet rapporté une sensibilité des composés phénoliques en solution à la lumière. La dialyse a aussi pour avantage d'être **peu coûteuse** mais la concentration des échantillons peut prendre plusieurs heures voir même plus d'une journée. Un des avantages de cette technique est le volume d'extrait déposé, qui peut être plus important que celui déposé dans cette étude: 5mL en mettant le boudin de dialyse dans un volume d'eau distillée également plus important (10 fois le volume déposé environ). Par ailleurs la dialyse est également **le seul procédé permettant d'éliminer le mannitol**, qui se retrouve dans le filtrat lors de l'utilisation de membranes coupant au dessus de 0.5 KDa. Le poids moléculaire du Mannitol est de 182.17 Da soit 0.2 KDa en arrondissant. Sa conformation ne permet pas son passage au travers des membranes de 0.5 KDa. Malgré cela les membranes coupant à 6KDa (dialyse) ne le retiennent pas. Les autres procédés, même en utilisant des membranes à seuil de coupure très élevé (jusqu'à 30KDa) retiennent tout de même une partie du mannitol (le reste passant au travers de la membrane). Ce phénomène est également visible dans d'autres études dans le cas de l'ultrafiltration, le mannitol est retrouvé dans le rétentat de la membrane 50KDa (Connan, 2004). Ce qui pourrait vouloir dire que celui-ci est lié à d'autres molécules ou encore que les membranes se retrouvent partiellement colmatées et ne permettent plus le passage même de petites molécules. Par ailleurs la dialyse jouant sur l'osmolarité des solutions et le mannitol étant hautement polaire et ayant donc une grande affinité pour l'eau cela pourrait expliquer son passage plus aisé au travers des membranes lors de la dialyse.

La concentration des molécules des extraits bruts à l'échelle testée au laboratoire (quelques millilitres pour des besoins analytiques) se fait plus aisément dans les tubes à centrifuger à membranes qui présentent l'avantage d'être peu coûteux comparé à l'ultrafiltration et la nanofiltration. Cependant, ce procédé bien que rapide et efficace, n'est pas transposable à l'échelle industrielle comme peuvent l'être les procédés de type ultrafiltration ou nanofiltration qui permettent d'atteindre un stade de production industrielle (échelle de la valorisation).

b) Taille des composés extraits et/ou semi-purifiés

Cette étude montre que la majorité des composés phénoliques chez *Sargassum muticum*, quelle que soit sa provenance géographique en Europe, **étaient de poids moléculaires élevés puisque supérieurs à 15-30 KDa**. Ces résultats différent de ceux obtenus sur la même espèce (Le Lann, 2009 ; Le Lann *et al*., 2012b) où la taille des CP ne semblait au contraire pas dépasser les 5 KDa chez des individus issus de zones tempérée ou tropicales. Cependant, les résultats obtenus sont en accord avec d'autres études ayant montré la présence de composés majoritairement de grande taille (12-14 KDa) chez les macroalgues brunes notamment chez certaines espèces de Fucales et de Laminariales (Connan *et al*., 2004). Les études effectuées par Connan (2004) montrent également l'utilisation de différents

procédés de séparation par taille des CP tels que la chromatographie d'exclusion, la dialyse ou encore l'ultrafiltration.

Il est important de préciser que l'on se trouve en présence d'un pool de composés pouvant donc contenir des phlorotannins de tailles différentes. Ce pool va subir des variations en terme de composition selon les saisons ou encore selon les conditions environnementales (Connan et *al*., 2004 ; Le Lann, 2009) Ainsi, il est difficile ici encore de comparer nos résultats avec ceux obtenus dans d'autres études. Il est également possible que certains éléments nous aient conduits à sous estimer la teneur en composés de petite tailles.

On peut émettre quelques hypothèses quant à la sous-estimation de la quantité de petits composés dans nos extraits :

- **les composés phénoliques pourraient être liés à d'autres composés de taille plus importante** tels que des polysaccharides et/ou des lipides membranaires par exemple. Ce qui empêcherait le passage des CP, même de petite taille, au travers des membranes;

- on pourrait se trouver face à de grands **changements de composition du pool en fonction des saisons et de la provenance géographique**. La répartition des composés par classe de taille pouvant évoluer pour une même espèce suivant sa provenance (Le Lann, 2009). Mais cela resterait étonnant compte tenu de l'importance des différences observées entre notre étude et les travaux publiés dans la littérature ;

- il pourrait également s'agir de **conformation différente des molécules** les empêchant de traverser les membranes. Les **composés de petites tailles pourraient avoir été exsudés au moment de la récolte**. Nous avons vu au paragraphe IV.2, que certains composés, en quantité non négligeable étaient exsudés dans l'eau de récolte. Il pourrait s'agir de petits composés qui ne seraient donc pas pris en compte lors de l'extraction;

- on peut se poser la question de la **méthode de mesure de la quantité de composés phénoliques retenus**. Dans notre étude la quantité de CP a été mesurée avant et après séparation ainsi que dans les deux fractions obtenues (rétentat et perméat). Aucune valeur n'est déduite et on a également pu mettre en avant de grande perte de CP par le biais du procédé de séparation en lui-même (CP restés probablement adsorbés sur les membranes) ;

- ce qui nous conduit à la dernière hypothèse suivante : **les petits composés seraient restés fixés aux membranes** du fait de la grande quantité de polysaccharides contenue dans les extraits et pouvant obstruer les pores. Ce **colmatage progressif des membranes peut diminuer leur seuil de coupure apparent.** D'autre part le modèle d'exclusion stérique de Ferry démontre que **des molécules de taille bien inférieure à celle des pores peuvent être retenues**. Mais cela n'explique toujours pas la différence entre notre étude et celle des autres auteurs pour la dialyse par exemple (Le Lann, 2009).

Cependant, nos résultats s'appuient sur des éléments solides :

Nous avons pu observer que les résultats obtenus par les différents procédés testés conduisent aux mêmes conclusions, c'est-à-dire que le pool de CP est majoritairement constitué de phlorotannins (dans leur conformation originelle ou liée à d'autres composés) de taille supérieure à 15 KDa. Ces composés aromatiques sont bien visibles dans les rétentats mais ne le sont pas dans les perméats en RMN du proton.

c) Inconvénients des procédés testés et alternatives proposées

Le procédé de nanofiltration n'a pas permis de conserver, dans les rétentats, **les activités anti-radicalaires** présentes initialement dans les extraits bruts avant séparation. Le mannitol reste très majoritaire dans les rétentats et empêche de visualiser correctement les signaux des aromatiques en RMN. Les composés phénoliques sont bien concentrés sur la membrane mais le mannitol l'est également. Il serait donc plus intéressant d'effectuer une séparation par nanofiltration sur des extraits purifiés ou même semi-purifiés. En revanche**, le mannitol n'est pas du tout visible dans les perméats ce qui signifie bien qu'il a été retenu dans sa totalité sur la membrane**. Cette information est plutôt intéressante, car dans le cas de petits composés (d'un diamètre inférieur à 0.68 nm) à récupérer, chez les algues contenant beaucoup de Mannitol, il suffirait de récupérer le perméat et de le concentrer par évaporation rotative par exemple. D'autres auteurs considèrent d'ailleurs ce procédé de nanofiltration comme une bonne alternative à la concentration des composés phénoliques. C'est ce que montrent par exemple les travaux de Murakami *et al*. (2011) sur les extraits de *Ilex paraguariensis.*

En ce qui concerne cette **concentration du mannitol conjointement aux composés phénoliques**, ce phénomène est constaté pour quasiment tous les procédés testés à l'exception de la dialyse (sur les membranes coupant à 6 et 12 KDa) et quel que soit le seuil de coupure des membranes utilisées. Il serait intéressant de tester des membranes coupant à des seuils supérieurs à 30 KDa, en dialyse ou en diafiltration par exemple afin de concentrer les composés de grande taille et de ne pas récupérer le mannitol dans le rétentat.

Enfin, si **les techniques testées dans cette étude n'ont pas permis d'atteindre le but recherché**, c'est-à-dire, d'obtenir des fractions contenant des composés de tailles différentes ; d'autres techniques permettant de séparer les molécules contenues dans un extrait suivant leur poids moléculaire existent et pourraient être testées. Il s'agit par exemple de la chromatographie d'exclusion (Connan, 2004) ou l'HPLC (Chabeaud *et al*., 2009) comme cela a déjà été testé sur des mélanges de peptides. Ces procédés pourraient donc être utilisés afin de déterminer la répartition en taille des composés dans le pool de phlorotannins extrait.

d) Perspectives et autres applications des procédés de séparation

Nous avons pu constater la capacité de la centrifugation, au moyen des tubes à centrifuger, à concentrer rapidement les échantillons. Cette **technique de centrifugation pourrait alors être utilisée dans le simple but de concentrer les échantillons avant des**

analyses. La concentration des composés phénoliques est relativement rapide puisque le temps de centrifugation ne dépasse pas 3h pour une membrane de 10KDa dans notre étude. L'inconvénient majeur est que le volume de rétentat où sont concentrés les composés actifs est très faible (quelques microlitres) par rapport à l'extrait déposé au départ (10mL). L'extrait concentré n'est donc pas facile à récupérer.

Le **procédé de dialyse pourrait être utilisé en fin de procédé de purification** afin de récupérer les composés les plus actifs (rétentats des membranes de 6 ou 12KDa). Nous avons également vu qu'il était possible, grâce à ce procédé d'éliminer le mannitol. D'autres auteurs ont déjà utilisé cette technique à des fins de purifications (Connan *et al*., 2004). Cette technique permet de traiter des volumes moyens. La récupération du rétentat est simple, et dans ce cas, elle se fait par la rupture du boudin de dialyse et récupération du contenu où sont concentrés les composés actifs.

IV.3.4.6. Détermination du type de structure des phlorotannins produits par *Sargassum muticum* en Europe

Suite aux résultats obtenus en Figure 5 dans Tanniou *et al*., 2013b (manuscrit présenté au paragraphe IV.3.3.1), nous avons effectué une analyse par RMN 2D ^{1}H-^{13}C des fractions enrichies en phlorotannins. Toutefois, les très faibles teneurs en phlorotannins chez *Sargassum muticum* provenant d'Irlande et d'Espagne, associées à une instabilité chimique de la fraction purifiée ne nous permettent pas de présenter ici les spectres pour ces échantillons. Sur les cinq pays étudiés, seuls les résultats d'analyse en RMN 2D de trois extraits d'entre eux ont été présentés (Figure 6 dans Tanniou *et al*., 2013b : manuscrit présenté au paragraphe IV.3.3.1). L'analyse HMBC peut être étudiée de la manière suivante (Figure IV.39).

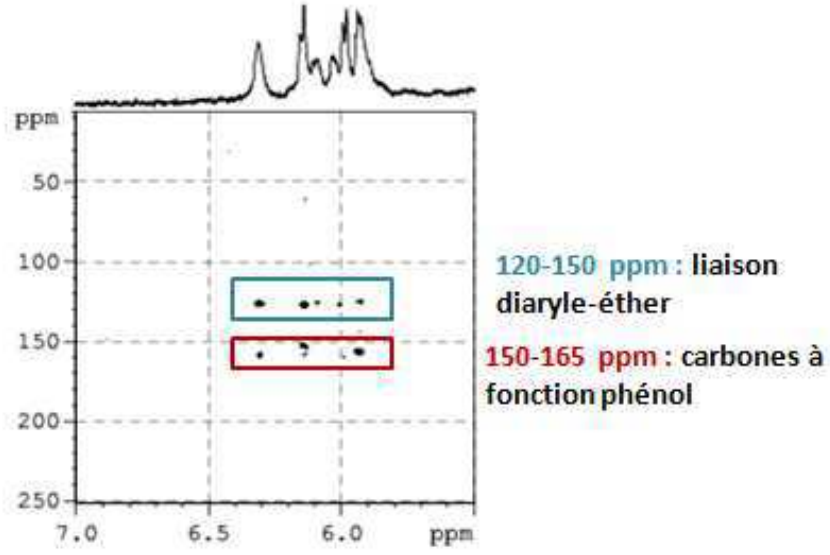


Figure IV.29. Agrandissement de la zone des aromatiques sur un spectre HMBC deux dimensions représentant les signaux « types » retrouvés dans les extraits obtenus à partir de la macrolagues de *Sargassum muticum* en Europe.

Le spectre HMBC (Figure IV.29) de *Sargassum muticum* montre une multitude de signaux sur la dimension ^{1}H, qui sont corrélés avec des carbones de type phénol (C-OH) et

impliqués dans des liaisons diaryle-éther entre cycles (C-O-C). Les résultats présentés dans la publication (Tanniou *et al*., 2013b Figure 6 du manuscrit présenté au paragraphe IV.3.3.1) montrent qu'on a le même type de profil quelle que soit la provenance géographique des algues. Il s'agit de composés de type phlorethol (Cérantola *et al*., 2006). Le nombre d'unités liées entre elles par des liaisons diaryle-éther reste cependant à déterminer. Des analyses en spectroscopie de masse devraient nous permettre de répondre à cette question.

IV.3.5.Conclusion

Nous avons donc vu que les composés phénoliques variaient en quantité et en qualité suivant les pays échantillonnés. Cette étude nous a permis de comprendre comment évoluait la teneur en CP suivant les paramètres environnementaux dans chacun des pays échantillonnés. Ainsi, nous savons que **leur concentration est positivement dépendante** :

-**de la salinité** dans la mesure où celle-ci reste comprise entre 34 et 37 psu ;

-**de la température de l'eau** dans la mesure où celle-ci est comprise entre 9 et 19 °C ;

-**de l'intensité lumineuse** dans la mesure où celle-ci reste comprise entre 37.5 et 42.5 Einstein.m^{-2}.sec^{-1}.

Cependant, nous ne pouvons pas connaître la responsabilité exacte de chacun des paramètres dans les teneurs en CP observées ; les différents paramètres pouvant agir de paire (Davison, 1987; Rautenberger et Bischof, 2006 ; Figueroa *et al*., 2010). Il semblait donc intéressant, afin de confirmer l'effet de chacun des paramètres pris à part, d'effectuer des manipulations en milieu contrôlé afin d'isoler le paramètre à tester.

Nous avons également montré qu'une purification efficace de ces composés était possible. Des deux protocoles testés, la séparation sur colonne SPE est la meilleure solution, elle permet d'obtenir des fractions MeOH-eau ou MeOH composées jusqu'à plus de 50% de CP aux activités anti-radicalaires comparables à celles des témoins positifs. L'activité des extraits semble donc bien liée à la présence de composés phénoliques pour ce qui est de l'activité anti-radicalaire. L'activité anti-oxydante mesurée par le test du Beta carotène en revanche semble liée à d'autres composés. Ce qui confirme des études précédemment réalisées sur cette même espèce (Plouguerné, 2006 ; Le Lann, 2009). Il existe cependant d'autres méthodes de récupération des CP, non basé sur leur polarité, comme par exemple la séparation par taille ou l'adsorption-désorption des composés Soto *et al.* (2011). La récupération de composés phénoliques d'adsorption peut se faire à partir de charbon actif, d'adsorbants minéraux tel que l'argile ou des matériaux siliceux par exemple et de résines. Ces méthodes comme les procédés de séparation que nous avons utilisés ont l'avantage d'être efficaces et respectueuses de l'environnement comparées à la séparation par des solvants organiques. Nous avons d'ailleurs démontré dans cette étude qu'il était possible de concentrer avec succès les CP avec les tubes à centrifuger ou la dialyse. Cela signifie qu'il y a des pistes prometteuses pour réaliser la même opération au stade industriel grâce à la filtration tangentielle (qui demande un peu plus de mise au point). Ces analyses nous ont par ailleurs

permis de connaître la taille des composés phénoliques présents chez *Sargassum muticum*, il s'agirait en majorité de composés de taille supérieure à 15 KDa.

Les extraits bruts et semi-purifiés étudiés dans ce chapitre possèdent des activités anti-ROS et antibactériennes très intéressantes et pourraient donc être utilisés pour de futures applications industrielles. Surtout que la macroalgue *Sargassum muticum*, envahissante en été, se retrouve en quantité importante sur l'estran le long des côtes européennes. Sa récolte serait alors possible dans toute l'Europe atlantique et en particulier dans les pays où les composés produits par la Sargasse semblent les plus actifs. C'est-à-dire en Norvège, France et Portugal pour les activités anti-radicalaires et réductrices du fer et dans toute l'Europe pour les activités anti-bactériennes suivant l'hôte ciblé. En effet nous avons vu au paragraphe IV.3 que les phlorotannins de *Sargassum muticum* à défaut de posséder des activités anti-oxydantes possèdent une très forte activité antiradicalaire, qui laisse présager de leur implication dans la gestion du stress oxydatif au niveau cellulaire. Cependant, à l'heure actuelle, en considérant le coût de purification de ces molécules, il est difficilement envisageable de valoriser leur activité antiradicalaire. Par contre, dans une démarche de bioraffinage de l'algue, les CP pourraient constituer l'une des fractions valorisables à côté d'autres fractions telles que les protéines, les lipides, les polysaccharides, et autres pigments, ou alginates. En revanche, il serait intéressant de procéder à d'autres tests d'activités biologiques (anti-inflammatoire, anticancéreuse, anti-VIH). En effet, les phlorotannins représentent aujourd'hui une source importante de nouvelles molécules à forte valeur ajoutée qui intéressent l'industrie pharmacologique (Kim *et al*., 2005 ; Ahn *et al*., 2006). De même, les extraits bruts obtenus à partir des algues prélevées en Europe possèdent des activités antibactériennes comparable à celle d'un antibiotique à large spectre d'action, le chloramphénicol ; et ce, à de très faibles concentrations (50 $\mu g.mL^{-1}$). Suivant les applications souhaitées, nos extraits sont actifs contre des pathogènes infectant l'être humain d'où leur intérêt en médecine humaine ; mais également contre de nombreux pathogènes d'espèces aquacoles ce qui représente un intérêt industriel considérable au vu des nombreuses exploitations présentes en Europe. Ainsi, notre travail ne constitue qu'une part de la première étape d'un long processus. Le développement de nouvelles substances bioactives nécessite beaucoup de temps. En effet, entre 10 à 20 ans sont nécessaires avant qu'une molécule ne soit commercialisable sous la forme d'un produit (médicament, cosmétiques…). De plus, d'après Di Masi *et al.* (1995), seulement 0,01 % des molécules testées *in vitro* reçoivent un agrément de mise sur le marché.

Enfin, grâce à la purification et aux analyses RMN du proton en une et deux dimensions, il a été possible de déterminer quel était le type de composés produits chez *Sargassum muticum*. Il s'agit de composés de type phlorethol uniquement et ce, quel que soit le pays considéré. Des analyses en HPLC et en masse des extraits bruts et purifiés ont été effectuées grâce à la participation de nos collaborateurs (Station biologique de Roscoff, Plateforme Biogenouest). Les résultats n'ont cependant pas pu être intégrés dans ce manuscrit ceux-ci n'ayant pas été communiqués pour le moment. **Les résultats de ces deux analyses devraient permettre d'en savoir plus sur la nature (HPLC) et la taille (Masse) des composés présents chez *Sargassum muticum*.** Cela permettrait par exemple de répondre à

une des questions posées : en effet, les composés, bien que semblant tous être de type phlorethol dans chacun des pays, présentaient pourtant des profils légèrement différents en RMN liquide du proton, il s'agirait donc sûrement de composés ne comptant pas le même nombre d'unités par exemple. D'autre part, l'étude en masse devrait permettre de lever le doute quant à la taille réelle des CP présents chez *Sargassum muticum*.

Notre étude a également montré que si une valorisation de *Sargassum muticum* devait être envisagée le long des côtes Atlantiques, ce sont les pays des extrémités du gradient, c'est-à-dire le Portugal et la Norvège qui devraient être privilégiés. Néanmoins, dans les pays tels la France, Irlande et l'Espagne où *S. muticum* ne présente pas de teneurs en composés phénoliques importantes, il serait possible de cultiver l'espèce sous des conditions stressantes afin de la forcer à produire des composés de stress tels que les composés phénoliques (forçage métabolique). Le suivi des populations, en milieu naturel nous permettant de penser que les paramètres environnementaux tels que la température et la lumière influencent la production de phlorotannins chez *Sargassum muticum*, nous avons souhaité tester ces deux paramètres en cultures contrôlées. **Ainsi, le paragraphe IV.4 présente les résultats, en conditions contrôlées, de l'effet de la température et des radiations UVA/UVB sur la production de phlorotannins chez *Sargassum muticum*.**

IV.4. Expérimentations en milieu contrôlé

IV.4.1.Introduction

Nous avons vu au paragraphe précédent que la teneur en composés phénoliques au sein des populations naturelles de macroalgues marines était dépendante des conditions environnementales comme par exemple la température de l'eau de mer ou l'intensité lumineuse reçue. Les fortes intensités lumineuses, et notamment l'augmentation actuelle de l'intensité des radiations UV-B due à l'amincissement de la couche d'ozone, peuvent être des facteurs stressants majeurs pour la plupart des organismes phototrophes peuplant les écosystèmes terrestres et aquatiques. Afin de mieux comprendre les réponses biochimiques liées à la production de CP face à deux acteurs du stress chez les algues, cette partie de mon travail de recherche visait à reproduire, en milieu contrôlé, un seul de ces stimuli. Nous souhaitions éviter ainsi les interactions entre les différents facteurs du milieu et ainsi dégager le facteur impactant majoritairement la teneur en CP chez l'algue brune *Sargassum muticum*.

A travers ces expériences, nous visons à répondre à plusieurs questions :

- Quel stimulus permet d'obtenir une réponse biochimique significative et en particulier une variation de la teneur en CP ?

- Comment se développe la réponse de l'algue dans le temps, en termes de métabolites majoritaires ?

- Quel est le comportement de l'algue en milieu contrôlé ? Se comporte-t-elle de la même manière qu'elle soit fixée à son support rocheux d'origine ou détachée de son support ?

- Comment peut-on améliorer le système de culture afin de tester au mieux l'effet des paramètres environnementaux en milieu contrôlé?

- Le forçage métabolique peut-il constituer l'une des voies permettant de lever certains verrous concernant le bioraffinage de l'algue ?

Deux expériences ont été menées. La première concerne l'effet des UV sur la production de CP par les algues ; les paramètres tels que la température et la salinité étaient alors fixés. Deux types de rayonnement UV ont été utilisés : les UV-A (320-400 nm) et les UV-B (280-320 nm). Au cours de la deuxième étape, nous nous sommes intéressés inversement à l'effet de la température de l'eau. Seule une augmentation de la température a été testée. Ainsi l'eau des bacs de culture était maintenue aux alentours de 22°C. La salinité et l'intensité lumineuse ont été alors fixées.

IV.4.2. Matériels et méthodes

IV.4.2.1. Matériel biologique

Des thalles de *Sargassum muticum* ont été récoltés sur le site du Dellec (*cf.* partie 1) entre février et mars 2013. Deux types de thalles ont été étudiés :

- des thalles fixés sur leurs supports (petits cailloux facilement transportables, permettant de remettre l'algue dans ses conditions naturelles de port vertical dans la colonne d'eau, et ainsi de ne pas apporter un stress supplémentaire aux individus en culture ;

- des thalles détachés de leur support : l'intégrité du thalle (crampons et latérales) a été conservée, mais l'individu se retrouve en flottaison dans la colonne d'eau.

Les thalles entiers, non épiphytés, non broutés, de taille et d'âge homogènes, ont été prélevés puis transférés dans les bacs de culture après récolte. Ainsi, en début d'expérience, trois individus par bacs ont été utilisés par condition testée. Pour chaque expérience, six bacs étaient donc utilisés : trois pour la condition témoin et trois pour la condition à tester. Les thalles y étaient répartis comme suit : deux bacs contenaient chacun trois thalles 'fixés' (n=6) et un bac contenait trois thalles 'non fixés' (n=3). Pour chaque condition testée et dans chacun des bacs, un fragment de thalle d'environ 3 cm provenant de chaque individu a été prélevé à chaque temps d'exposition à t=0, 5, 15 et 25 jours. Les échantillons sont ensuite directement congelés puis conservés à -25°C. Ils seront lyophilisés juste avant les tests afin d'éviter au maximum toute réhydratation des échantillons.

IV.4.2.2. Système utilisé pour le maintien de biomasse algale au laboratoire

Six aquariums en PVC de 40 L sont placés en salle thermostatée à 17°C, sous lumière blanche, fournie par 4 néons Philips TL-D Master Super 80 36W/865 permettant d'atteindre une irradiance d'environ 70 µmoles.m^{-2}.s^{-1} en surface des bacs (soit environ 15.33 W.m^{-2}).

Les bacs sont alimentés en continu en eau de mer filtrée sur sable avec un temps de renouvellement total de l'eau d'environ 40 min et aérés à l'aide d'une rampe d'air au fond des bacs (Figure IV.30).

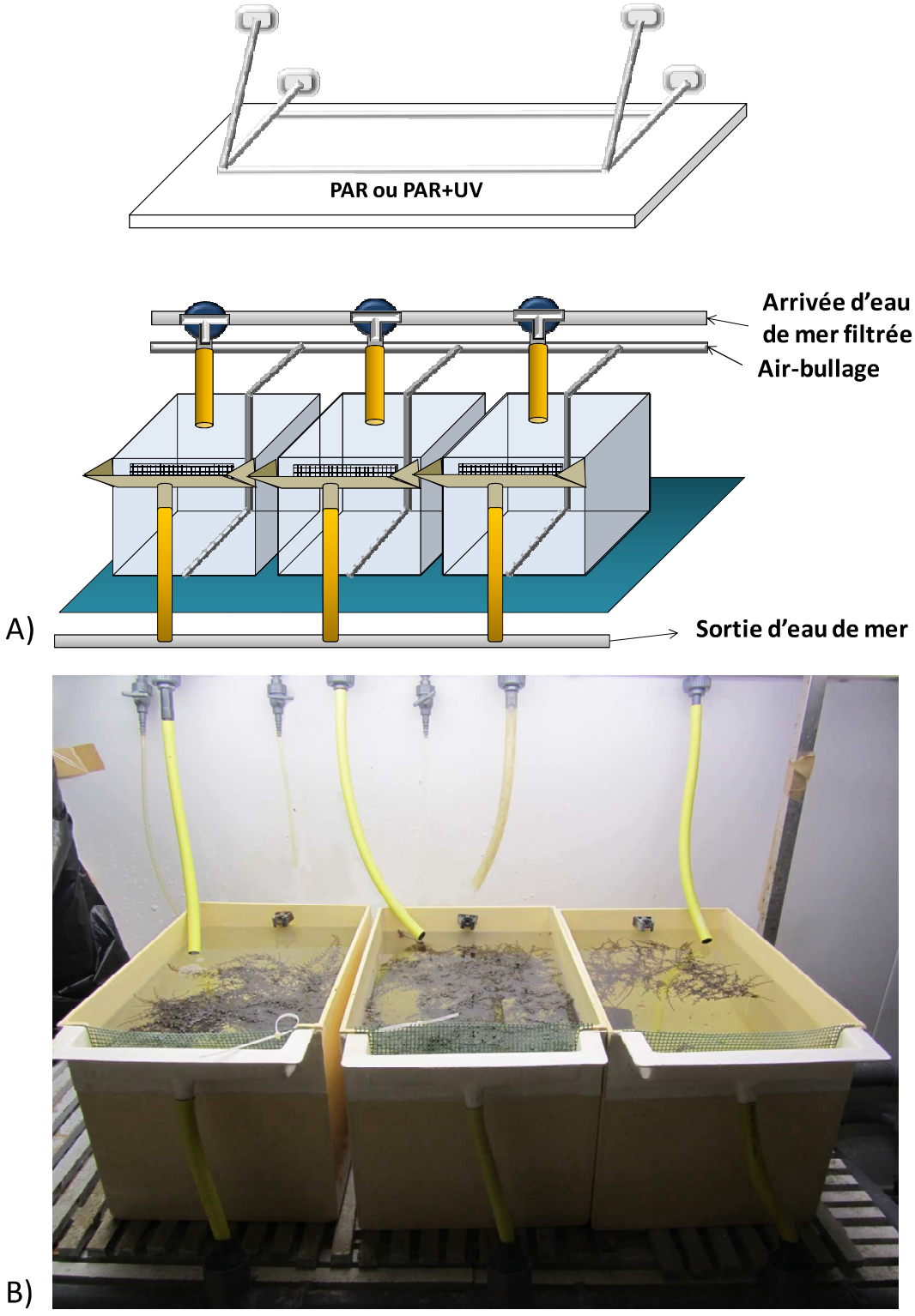


Figure IV. 30. Système de culture mis en place au laboratoire pour le maintien d'algues fraîches après récolte. A) Schéma du système expérimental et B) Photo de trois bacs expérimentaux présentant des thalles de *Sargassum muticum*.

IV.4.2.3. Effet des UV-A/UV-B sur la production de CP par les algues

Dans un premier temps, l'effet de la qualité de l'éclairement sur la production de CP a été testé. Pour cela, trois bacs 'tests' ont été exposés aux UV-A/UV-B (PAR+UV), durant une période de 30 jours et en parallèle, trois bacs 'témoins' ont été exposés à de la lumière blanche (PAR).

Un fragment de thalle d'environ 3 cm provenant de chaque individu présent dans chacune des conditions testées 'Bacs PAR+UV' versus 'Bacs témoin PAR', a été prélevé tous les 10 jours environ. Les teneurs totales en composés phénoliques ainsi que les profils chimiques obtenus en RMN *in vivo* ont été comparés entre les deux conditions d'exposition, à la lumière blanche seule (PAR) ou additionnée d'un rayonnement Ultraviolet (PAR+ UV).

Le système mis en place était le suivant : six aquariums en PVC de 40 L sont placés en salle thermostatée à 17°C, trois aquariums témoins sous lumière blanche et trois aquariums sous lumière blanche additionnée de 4 tubes fluorescents UV (A+B) (Figure IV.31). Afin de tester l'effet d'une irradiation en UV-A et B, un tube fluorescent UV-B Q-panel 313 nm et un néon UV-A 351 nm sont disposés en alternance avec 2 tubes fluorescents « lumière visible » Philips TL-D Master Super 80 36W/865, également utilisés pour les témoins. Les intensités des rayons UV sont mesurées avec un radiomètre UVX (UVP, Cambridge, UK). L'irradiation appliquée est en moyenne de 3,6 $W.m^{-2}$ pour les UV-B et de 2.5 $W.m^{-2}$ pour les UV-A. La lumière visible est mesurée à l'aide d'un quantamètre SQL-2101 (Biospherical Instrument Inc., San Diego, USA). L'intensité appliquée en surface de l'eau est de 70 $\mu moles.m^{-2}.sec^{-1}$ (soit environ 15.33 $W.m^{-2}$) (Tableau IV.10). Les bacs sont alimentés en continu en eau de mer filtrée sur sable avec un temps de renouvellement total de l'eau d'environ 40 min et aérés à l'aide d'une rampe d'air au fond des bacs (Figure IV.31).

Tableau IV. 10. Irradiances mesurées en surface des bacs pour les deux traitements lumineux : témoin (PAR seul) et UV (PAR+UV-A/B).

Traitement	PAR (400-700 nm) $W.m^{-2}$	UV-A (320-400 nm) $W.m^{-2}$	UV-B (280-320 nm) $W.m^{-2}$	Proportion de chaque radiation dans le traitement		
				%PAR	%UV-A	%UV-B
PAR seul	15.33	-	-	100	-	-
PAR + UV-A/B	15.33	2.52	3.60	71.47	11.75	16.78

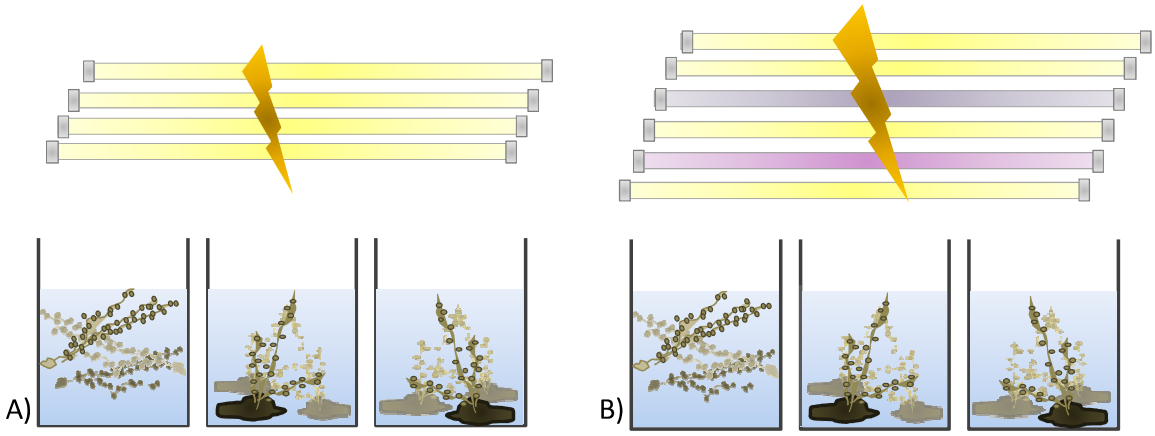


Figure IV.31. Système mis en place pour la mesure de l'effet de l'intensité lumineuse sur la production de CP par *Sargassum muticum* en milieu contrôlé. A) Bacs témoins (PAR seul) et B) Bacs traités aux UV-A et B (PAR + UV-A/B).

IV.4.2.4. Effet de la température de l'eau sur la production de CP

Dans un deuxième temps, l'effet de la température de l'eau sur la production de CP a été testé. Pour cela, trois bacs 'tests' ont été exposés à une température élevée d'environ 22°C, durant une période de 30 jours et en parallèle, 3 bacs 'témoins' ont été maintenus à 11°C.

Un fragment de thalle d'environ 3 cm provenant de chaque individu présent dans chacune des conditions testées 'Bacs à 22°C' versus 'Bacs témoin à 11°C', a été prélevé tous les 10 jours environ. Les teneurs totales en composés phénoliques ainsi que les profils chimiques obtenus en RMN *in vivo* ont été comparés suivant la température de l'eau de mer dans les bacs de culture (11°C dans les bacs 'témoins' et 22°C dans les bacs 'tests').

Le système mis en place était le suivant : six aquariums en PVC de 40 L sont placés en salle thermostatée à 17°C, les six aquariums sont soumis à un éclairement dans le visible seulement (PAR) à environ 70 µmoles.m^{-2}.s^{-1} fourni par quatre tubes fluorescents Philips TL-D Master Super 80 36W/865 (soit environ 15.33 W.m^{-2}). Afin de tester l'effet de la température de l'eau, trois bacs témoins sont alimentés en eau de mer filtrée sur sable à une température d'environ 11°C et les trois bacs tests, alimentés par la même eau sont chauffés au moyen d'une résistance (RENA Cal 100W, 100L) à une température d'environ 22°C (homogénéisée grâce au bullage au fond des bacs) (Figure IV.32). L'eau des bacs est, comme pour la première expérience renouvelée régulièrement. Le temps de renouvellement total de l'eau est d'environ 40 min. La température de l'eau est donc soumise à variations au moment du renouvellement de l'eau. Elle ne sera donc pas totalement homogène au cours de l'expérience (Figure IV.33).

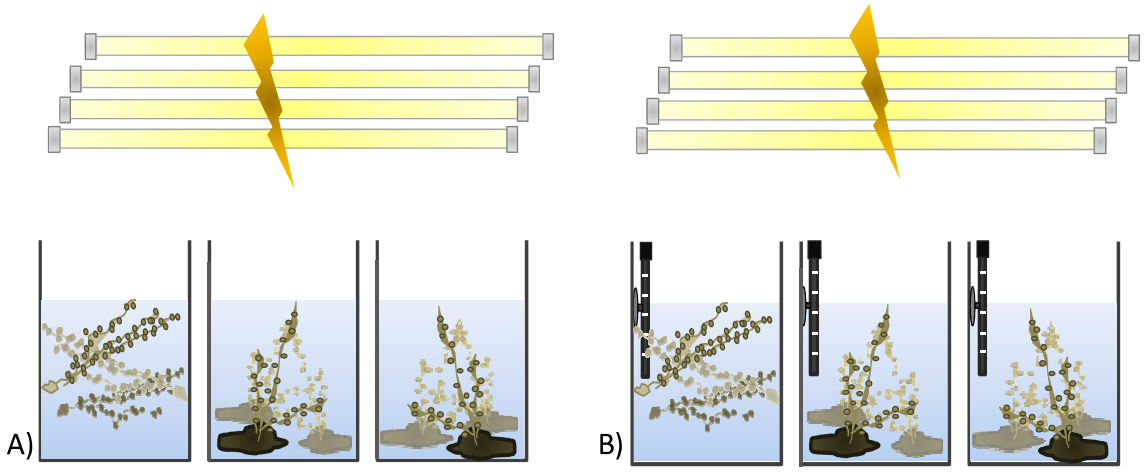


Figure IV.32. Système mis en place pour la mesure de l'effet de la température de l'eau sur la production de CP par *Sargassum muticum* en milieu contrôlé. A) Bacs témoins (11°C en moyenne) et B) Bacs chauffés au moyen d'une résistance (22°C en moyenne).

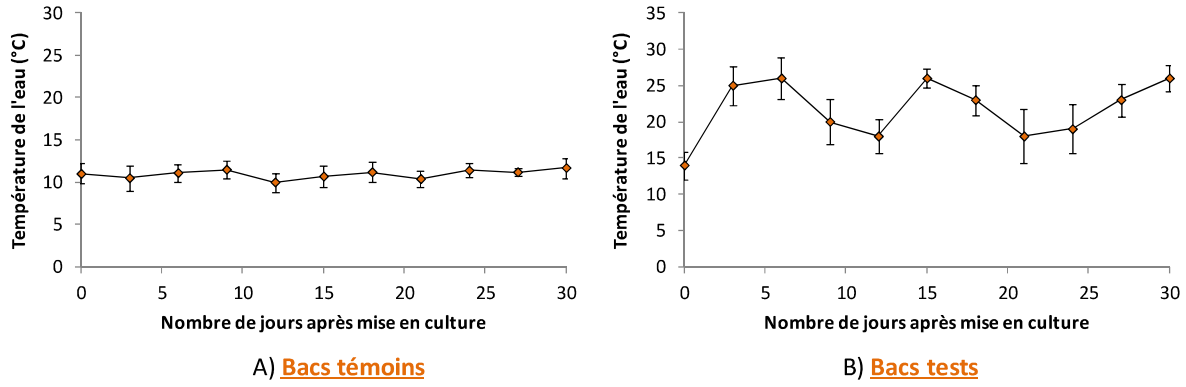


Figure IV.33. Température de l'eau dans A) les bacs témoins sans résistance et B) dans les bacs tests munis d'une résistance chauffante.

IV.4.2.5. Mesures effectuées sur les échantillons prélevés

La teneur en composés phénoliques a été mesurée par le dosage de Folin-Ciocalteu (*cf.* Chapitre I), suite à l'extraction des CP effectuée séparément sur trois fragments de thalle de trois cm chacun environ, provenant d'un même bac à un temps donné ; les valeurs ont ensuite été moyennées. En parallèle, une analyse RMN HR-MAS (*cf.* Chapitre I) a été réalisée pour chacune des conditions sur un seul fragment de thalle. Ainsi, nous avons pu obtenir un suivi dans le temps de la teneur en CP et une empreinte chimique (montrant les métabolites majoritaires) afin de suivre leur évolution dans le temps (30 jours) au sein d'un même individu.

Des analyses statistiques ont ensuite été effectuées sur les données provenant du dosage des composés phénoliques afin de dégager des tendances. Des ANOVAs à un facteur ou multifactorielles ont donc été effectuées après avoir préalablement vérifié l'homoscédasticité des variances par le test de Brown-Forsythe. Lorsque des différences significatives étaient visibles, un test *a posteriori* de Tukey a été réalisé.

IV.4.2.6. Mise au point d'un système électronique de simulation des marées

Afin de se rapprocher au maximum des conditions naturelles sur nos côtes, il a été décidé d'appliquer à nos cultures un système de marées. Chaque bac devait pouvoir être rempli et vidé en eau de mer pour simuler un cycle de marée : 6h de montée progressive de l'eau, ¼ d'heure d'immersion, 6h de descente continue et ¼ d'heure d'émersion (Annexe n°5). Ce cycle a été choisi pour reproduire le régime de marée subi par *S. muticum* en milieu naturel.

Dans un premier temps un système de régulation par automate avait été pensé : l'automate permettait d'effectuer des mesures de pH et de température régulièrement et de façon automatique tout en nécessitant l'utilisation d'une seule sonde capable, grâce à un charriot motorisé monté sur rails, de plonger dans chacun des bacs et d'enregistrer les mesures effectuées. Ce banc de test avec un automate aurait contrôlé le remplissage et la vidange des bacs au rythme des marées, avec oxygénation et gestion de l'éclairage (rythme jour/ nuit basé sur le rythme solaire). Mais devant les impératifs budgétaires, le système a dû être simplifié et seule une régulation électronique utilisant des relais temporisés a été finalement choisie parmi les options possibles. Des électrovannes, commandées par une armoire électrique (Annexe n°5) et placées en entrée et sortie du système permettent aux bacs de se vider et de se remplir sans l'intervention d'une pompe. Enfin, cette armoire a été conçue de manière à répondre aux normes de sécurité en cours au laboratoire. Ce système, bien que non utilisé durant cette thèse, devrait être utilisé au laboratoire afin de poursuivre l'exploration des réponses métabolique des algues face à différents paramètres fixés. Dans un souci d'homogénéité, neuf bacs ont été reconstruits suivant le schéma présenté en annexe ; il est maintenant possible de tester, simultanément, deux conditions (2x3 bacs) à comparer avec une condition témoin (les trois bacs restant).

IV.4.3. Résultats

Les résultats obtenus montrent un effet différent du couplage UV-A/UV-B et de la température sur la production en composés phénoliques et en métabolites majoritaires chez *Sargassum muticum*.

IV.4.3.1. Impact des UV-A et UV-B

Nous avons suivi l'impact des UV (UV-A et UV-B) sur l'évolution des métabolites majoritaires (obtention d'empreintes chimiques par RMN HR-MAS) et sur l'évolution des teneurs en composés phénoliques (dosés après extraction) de *Sargassum muticum.*

a) Empreintes chimiques obtenues par RMN HR-MAS

La figure IV.34 montre l'évolution de la composition chimique (métabolites majoritaires) de l'algue libre (non fixée à un support, 'témoin PAR libre') lors du maintien en milieu contrôlé sous lumière blanche (PAR). Les spectres obtenus au cours du temps sont

qualitativement proches, seules quelques différences (flèches orange sur la figure IV.34) sont visibles ; par exemple, entre le t_0 et le t_{final} (après 25 jours de culture), on remarque une augmentation sensible du pic (singulet) situé à environ 3.20 ppm. Les proportions des différentes espèces chimiques présentes semblent également évoluer. Ainsi, pour le compartiment qui nous intéresse, c'est-à-dire les composés aromatiques, entre 5.5 et 6.5 ppm, on observe une augmentation de la hauteur des signaux pouvant correspondre à une augmentation de la quantité de composés présents.

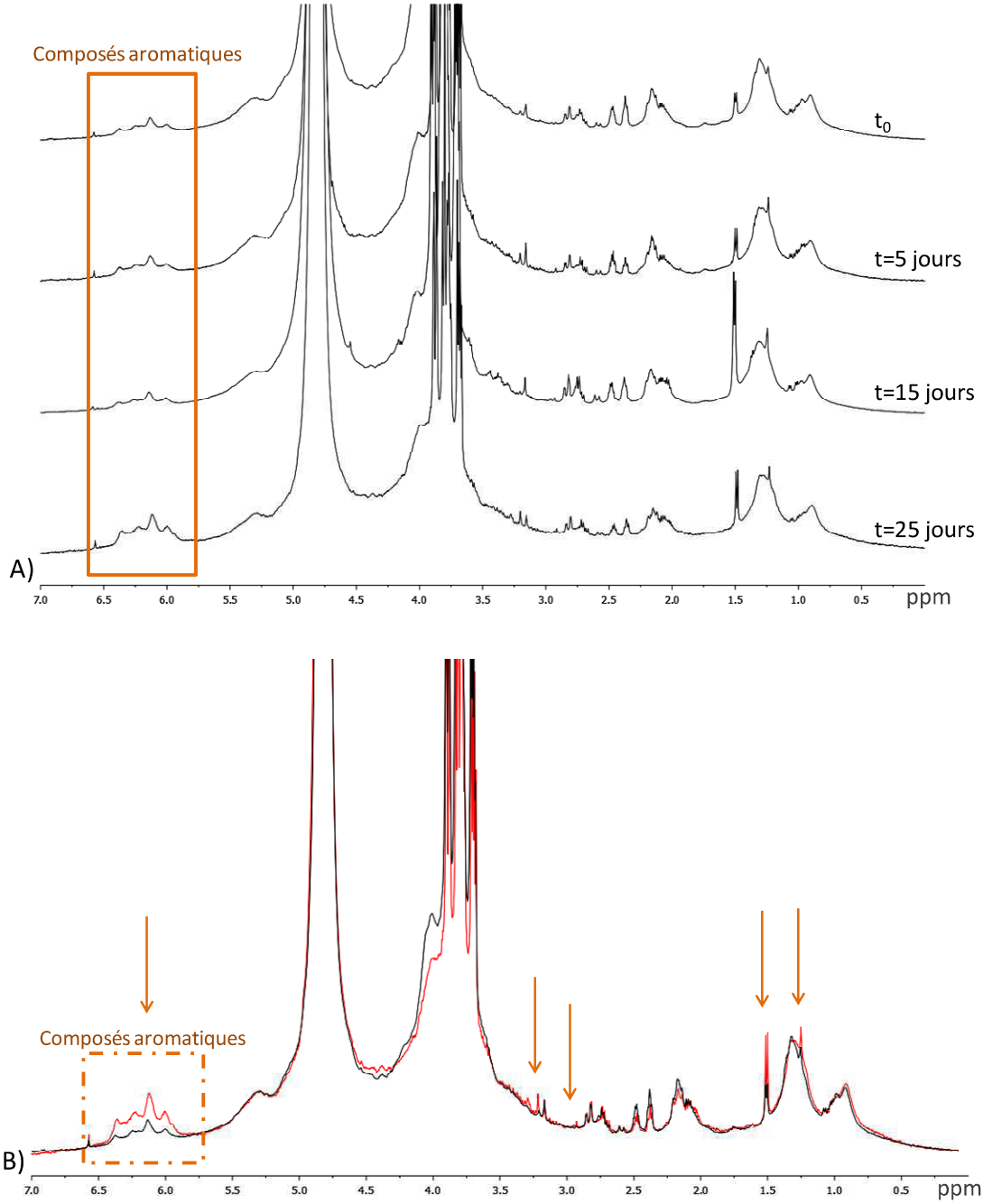


Figure IV.34. Spectres obtenus sur les individus témoins 'PAR-libres' A) Evolution dans le temps du contenu biochimique de *Sargassum muticum*; B) Comparaison début-fin t_0 (noir) et t=25 jours (rouge). Les flèches orange pointent les différences d'intensités majeures entre les deux spectres.

La figure IV.35 permet de voir comment évolue la composition chimique de l'algue fixée ('témoin PAR fixé') lors du maintien en milieu contrôlé sous lumière blanche (PAR). On peut ainsi voir que les spectres montrent peu/pas de différences qualitatives ou même quantitatives au cours du temps. Les proportions des différentes espèces chimiques présentes ne semblent pas évoluer sensiblement à l'exception de quelques pics dont l'intensité semble varier : comme le singulet présent vers 3.15 ppm. En ce qui concerne les composés aromatiques, aucune évolution sensible de l'intensité des pics n'est visible.

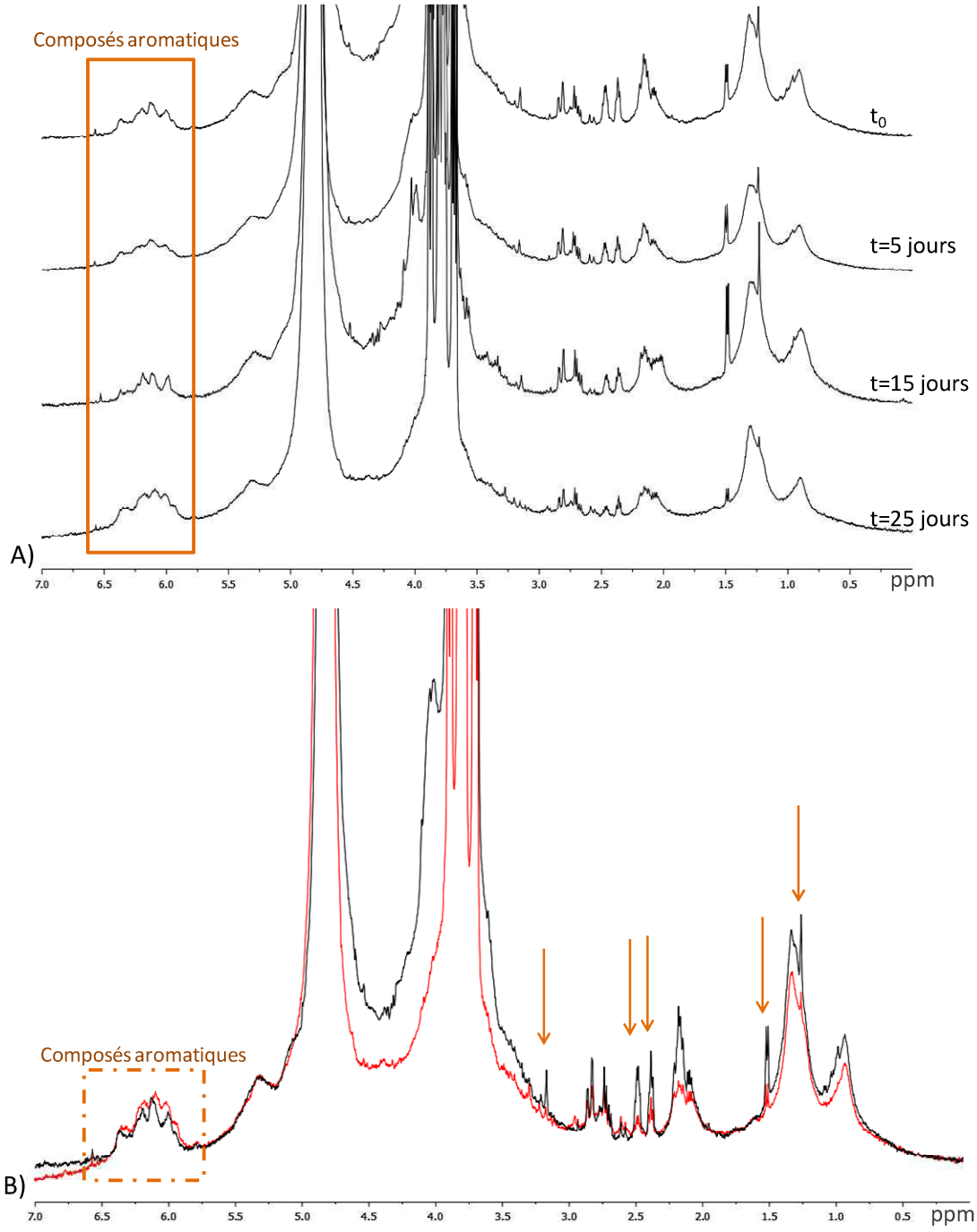


Figure IV.35. Spectres obtenus sur les individus témoin 'PAR-fixés' A) Evolution dans le temps du contenu biochimique de *Sargassum muticum* ; B) Comparaison début-fin t_0 (noir) et t=25 jours (rouge). Les flèches orange pointent les différences d'intensités majeures entre les deux spectres.

La Figure IV.36 permet de voir comment évolue la composition chimique de l'algue libre (non fixée à un support) soumise à un fort éclairement (PAR+UV-A/B). On peut ainsi voir que les spectres montrent quelques différences qualitatives au cours du temps. Les proportions de certaines espèces chimiques présentes semblent évoluer : singulet 3.15 et 3.20 ppm et certains pics entre 1.0 et 2.5 ppm. Pour le compartiment qui nous intéresse, c'est-à-dire les composés aromatiques, on ne voit cependant pas de différence quant au profil global ou à la hauteur des pics.

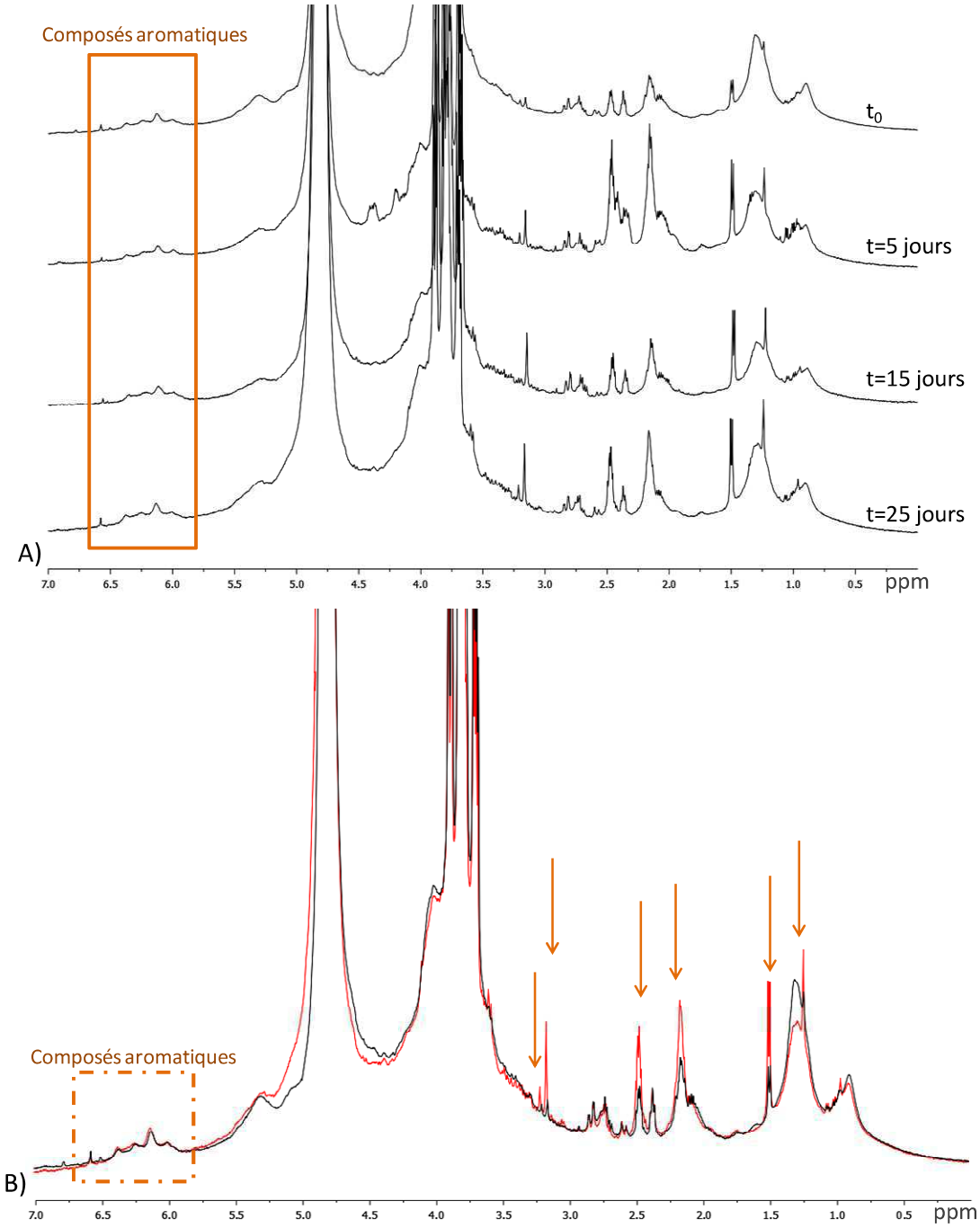


Figure IV.36. Spectres obtenus sur les individus tests 'UV-A/B-libres'. A) Evolution dans le temps du contenu biochimique de *Sargassum muticum*; B) Comparaison début-fin t_0 (noir) et t=25 jours (rouge). Les flèches orange pointent les différences d'intensités majeures entre les deux spectres.

La Figure IV.37 permet de voir comment évolue la composition chimique de l'algue fixée à un support soumise à un fort éclairement (PAR+UV). On peut ainsi voir que les spectres montrent peu/pas de différences qualitatives au cours du temps. On observe cependant quelques différences (flèches bleues-figure) entre le t=0 et le t=final comme par exemple une augmentation sensible du pic (singulet) situé à environ 3.15 ppm. Les proportions des différents métabolites majoritaires présents semblent également évoluer. Ainsi, pour le compartiment qui nous intéresse, on peut voir une augmentation de la hauteur des signaux pouvant correspondre à une augmentation de la quantité de composés présents.

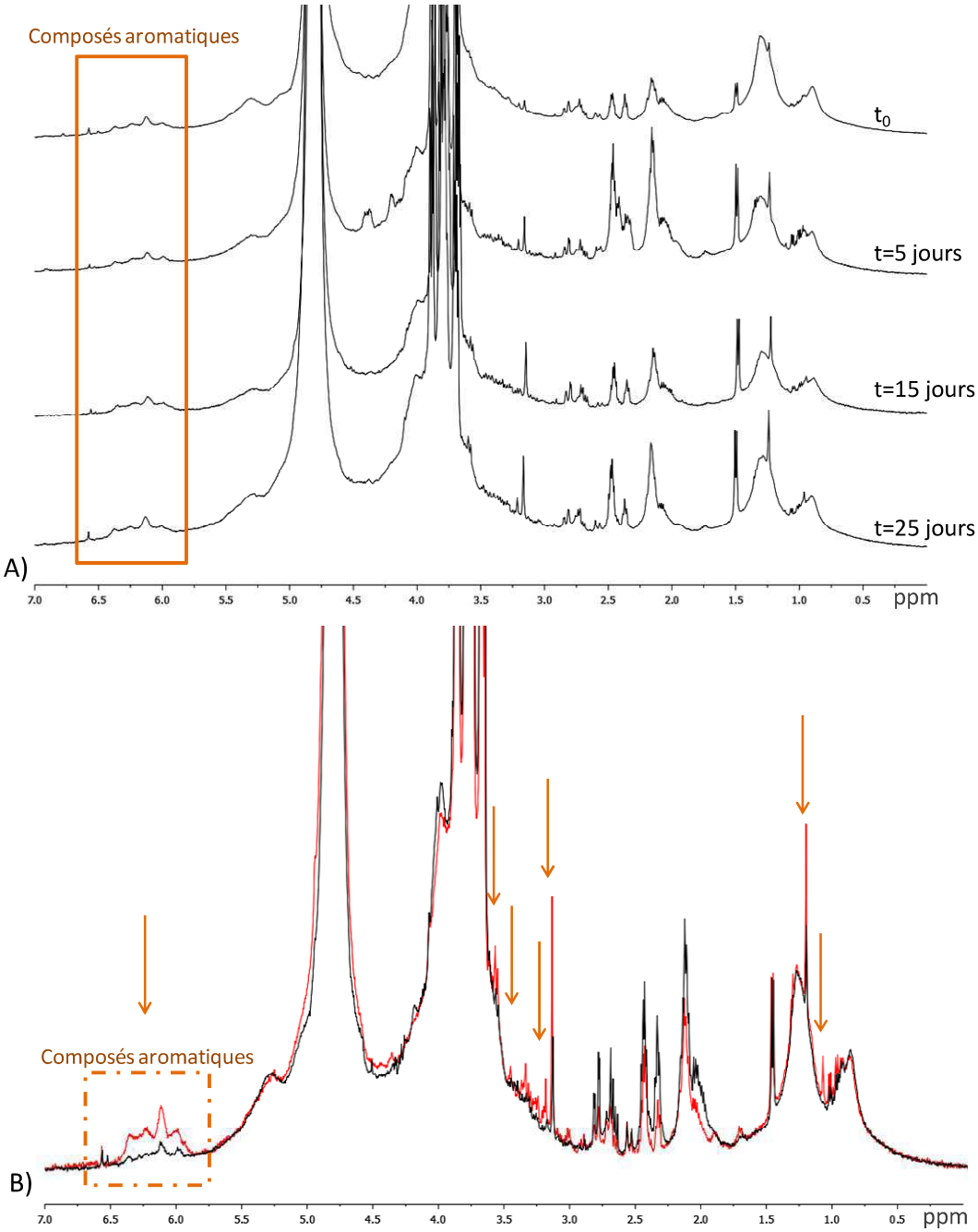


Figure IV.37. Spectres obtenus sur les individus tests 'UV-A/B-fixés'. A) Evolution dans le temps du contenu biochimique de Sargassum muticum; B) Comparaison début-fin t0 (noir) et t=25 jours (rouge). Les flèches orange pointent les différences d'intensités majeures entre les deux spectres.

b) Teneurs totales en composés phénoliques

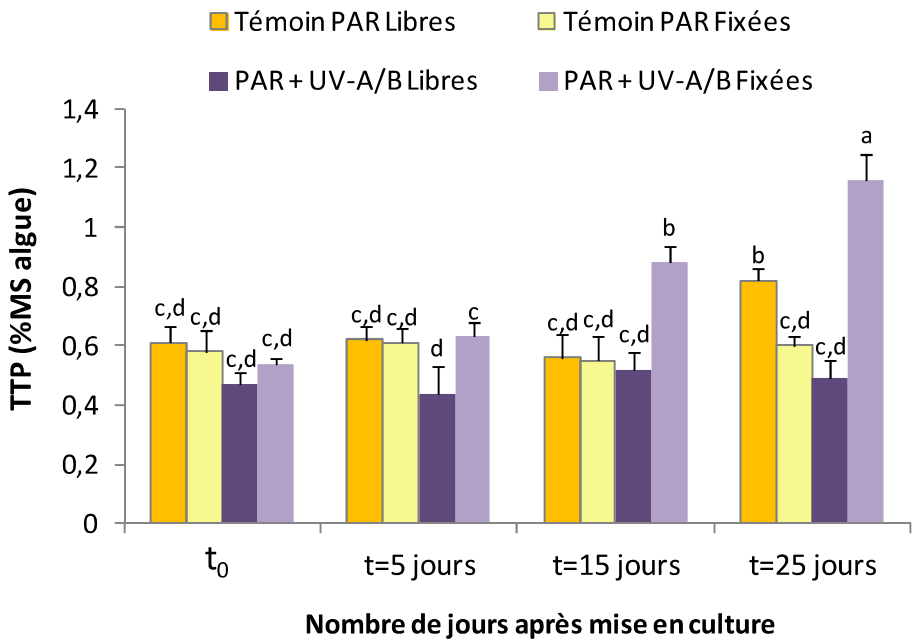


Figure IV.38. Evolution de la teneur totale en composés phénoliques (TTP), exprimée en % de la matière sèche de l'algue *Sargassum muticum*, en fonction des différentes conditions testées (avec ou sans UV) et suivant que les thalles soient fixés ou non à un support rocheux. L'axe des abscisses représente l'évolution de ces teneurs dans le temps, une mesure a été effectuée au lancement de l'expérience (to) puis à t=5, 15 et 25 jours. Les lettres correspondent aux résultats du test *a posteriori* mené après l'ANOVA à deux facteurs (Tukey, p< 0.05).

La figure IV.38 présente l'évolution de la quantité totale de composés phénoliques (TTP) en fonction du temps dans les différentes conditions expérimentales. Ainsi, en début d'expérience, la teneur moyenne de départ chez les individus étudiés était de 0.55 ± 0.06 $\%MS_{algue}$. Après 25 jours d'expérience, la teneur en CP la plus importante (1.16 ± 0.09 $\%MS_{algue}$) est atteinte chez les individus fixés soumis à un éclairement « PAR + UV ». Cette quantité parait donc doubler lors de l'application d'un rayonnement ultraviolet chez *Sargassum muticum*. Par ailleurs, les tests statistiques effectués confirment que :

- L'effet de la fixation de l'algue sur la teneur en CP est significatif (p=0.015, ANOVA à un facteur) quelles que soit les conditions d'éclairement et la durée de maintien en milieu contrôlé, avec une augmentation de la teneur en CP chez les individus fixés par rapport à ceux qui sont libres dans la colonne d'eau (Tukey p<0,05).

- Au cours du temps, en condition de stress (UV-A/UV-B), la quantité de composés phénoliques produits par les algues fixées double significativement (p=0.015, ANOVA à un facteur) entre t_0 et T_{final} (Figure IV.38). Par ailleurs les résultats suggèrent un effet de l'intensité lumineuse dès 15 jours d'exposition aux UV.

- On observe un effet croisé significatif (p<0.001, ANOVA à deux facteurs) de l'état de l'algue dans le milieu : « fixée » ou « libre » avec les conditions d'éclairement (PAR ou PAR+UV). Ainsi, on observe une augmentation au cours du temps de la quantité de composés

phénoliques dans les algues libres et pas dans les algues fixées lorsque la lumière blanche seule est utilisée alors qu'on observe une augmentation de la teneur en CP dans les algues fixées et pas dans les algues libres lorsque les UV sont utilisés.

IV.4.3.2. Impact de la température

Nous avons suivi l'impact de la température sur l'évolution des métabolites majoritaires (obtention d'empreintes chimiques par RMN HR-MAS) et sur l'évolution des teneurs en composés phénoliques (dosés après extraction) de *Sargassum muticum.*

a) Empreintes chimiques obtenues par RMN HR-MAS

Les spectres RMN HR-MAS obtenus dans le cadre de cette expérience n'ont pas été ajoutés dans ce manuscrit, les composés aromatiques qui nous intéressent n'étant pas visibles sur les spectres obtenu; et ce, même avant la mise en culture sur les thalles fraichement récoltés (problème de résolution en RMN?). Un pic très intense correspondant à l'eau est visible sur les spectres ce qui peut masquer les signaux des espèces chimiques non majoritaires comme les CP. Il est possible que même après lyophilisation les échantillons soient restés trop hydratés.

b) Teneurs totales en composés phénoliques

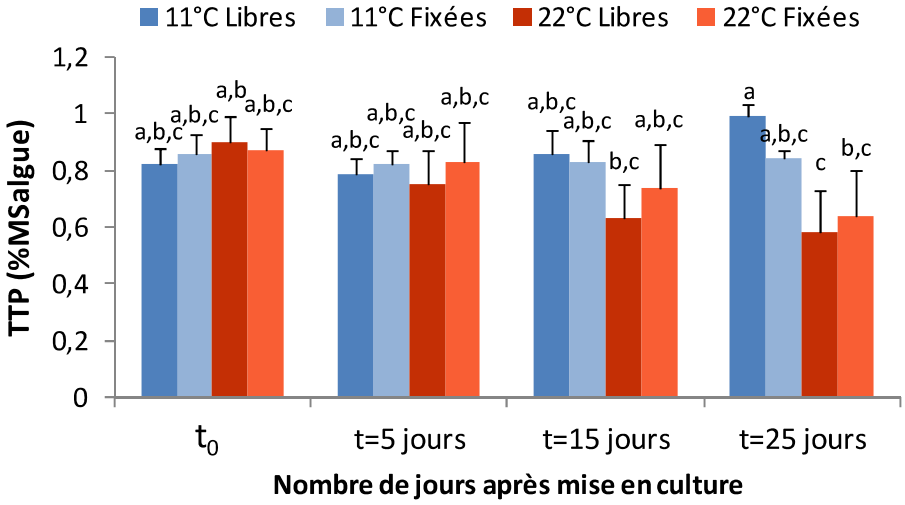


Figure IV.39. Evolution de la teneur totale en composés phénoliques (TTP), exprimée en % de la matière sèche de l'algue *Sargassum muticum*, en fonction des différentes températures testées (11 ou 22°C) et suivant que les thalles soient fixés ou non à un support rocheux. L'axe des abscisses représente l'évolution de ces teneurs dans le temps, une mesure a été effectuée au lancement de l'expérience (to) puis à t=5, 15 et 25 jours. Les lettres correspondent aux résultats du test *a posteriori* mené après l'ANOVA à deux facteurs (Tukey, p< 0.05).

La figure IV.39 met en évidence l'évolution, au cours du temps, de la teneur totale en composés phénoliques (TTP), dans l'algue en fonction des différentes conditions de température (11°C versus 22°C) chez des individus fixés et libres dans la colonne d'eau. En moyenne, la teneur en CP de départ chez les individus cultivés à 11°C était de 0.86 ± 0.03 %MS algue.

Suite à une augmentation de la température de l'eau (22°C), la quantité de CP a tendance à diminuer. Ainsi, on peut voir que la concentration la moins importante est atteinte chez les algues libres soumises à une forte température au bout de 25 jours, qui produisent alors 0.58 ± 0,15 %MS algue.

Par ailleurs, les tests statistiques effectués sur le jeu de données nous apprennent que :

- La teneur en CP ne varie pas significativement entre des individus fixés ou libres dans la colonne d'eau ($p=0.742$, ANOVA à un facteur) quelles que soit les conditions de température.

- La température a un effet significatif ($p<0.01$) sur la teneur en CP, avec une augmentation des teneurs en CP à 22°C par rapport à celles déterminées chez des individus cultivés à 11°C (Tukey $p<0.05$).

IV.4.3.3. Résumé des résultats obtenus pour les deux conditions testées

Le Tableau IV.11 résume les résultats obtenus dans cette étude. Ainsi on peut voir sur ce tableau si les paramètres testés ont un effet sur la teneur en composés phénoliques dans les algues fixées ou non à leur support d'origine. L'effet est considéré comme significativement positif ou négatif lorsque les tests statistiques ont démontré un effet significatif des paramètres au cours du temps.

Tableau IV.11. Effet des différents paramètres testés au cours du temps suivant que les algues soient fixées ou non à un support rocheux.

		algues 'fixées'	algues 'libres'
Température de l'eau	non chauffée (11°C)	*n.s.*	*n.s.*
	chauffée (22°C)	-	-
Eclairement (plage de longueurs d'onde couverte)	PAR (400-700 nm)	*n.s.*	+
	PAR+UV (280-700 nm)	+	*n.s.*

n.s., non significatif (lorsque les tests statistiques n'ont pas montré de différences significatives) ; « + » ou «-« lorsque l'effet significatif des paramètres sur la teneur en CP était positif ou négatif, respectivement.

IV.4.4. Discussion

IV.4.4.1. Effet de l'intensité lumineuse sur la quantité de composés phénoliques produits par *S.muticum* en conditions contrôlées

Nos résultats suggèrent qu'il existe un réel effet de l'intensité lumineuse et des UV sur la production de CP chez *Sargassum muticum*.

Notre étude a montré que l'application d'un rayonnement UV durant le maintien des algues en milieu contrôlé n'était pas forcément le seul déclencheur de la réponse biochimique

observée. En effet, la quantité de CP produits par les algues 'témoins' soumises uniquement à la lumière blanche augmente également au cours du temps. La qualité et la quantité de lumière reçue jouent donc un rôle sur la production de composés phénoliques par les algues. Différents travaux portent sur l'influence des UV sur la production des CP. Ainsi, Pavia *et al.* (1997) ont montré chez *A. nodosum* une augmentation de 30% de la teneur en CP lorsque les algues sont soumises à 50% d'augmentation des rayonnements UV-B reçus. Le même constat a été fait par Henry et Van Alstyne (2004) sur *Fucus gardneri* en culture contrôlée en laboratoire avec une augmentation du rayonnement UV-B. Nous avons ainsi montré par notre expérimentation en milieu contrôlé, que *Sargassum muticum* est capable de défense induite, c'est-à-dire que suite à un stress radiatif, ici l'exposition aux UV-A/UV-B ou à une augmentation de l'intensité lumineuse atteignant 15.33 $W.m^{-2}$ (PAR), l'espèce répond en augmentant ses teneurs en CP qui, au terme de 25 jours atteignent, respectivement, 2.15 et 1.34 fois la teneur initialement mesurée (à t_0).

Nos résultats ont montré que dès une exposition de 15 jours, un effet significatif des UV (UV-A et UV-B) est notable sur la production de CP par les algues. Cette rapidité de réponse est comparable à celles observées chez la macroalgue *A. nodosum* dans les travaux de Pavia *et al.* (1997) où l'augmentation de la teneur en composés phénolique était visible au bout de deux semaines également. D'autres espèces comme *Macrocystis integrifolia* (Swanson et Druehl, 2002) mettent en place une réponse plus rapide ; ainsi une augmentation significative de la quantité de phlorotannins dans les tissus algaux est mesurable au bout de quelques heures (4 à 8 heures) d'exposition seulement. Cependant, les mesures faites dans cette étude (Swanson et Druehl, 2002) n'ont été faites que sur un laps de temps très court ne dépassant pas quelques heures. Un suivi horaire serait donc nécessaire pour compléter notre étude afin de vérifier si la réponse des algues ne fluctue tout simplement pas au cours de la journée. Nous pourrions ainsi comparer les résultats à ceux obtenus par Swanson et Druehl (2002).

IV.4.4.2. Effet de la température de l'eau sur la quantité de composés phénoliques produits par *S.muticum* en conditions contrôlées

Pour les Effets de la température sur la production de CP en milieu contrôlé, les **conclusions semblent différentes de celles obtenues en milieu naturel**. Nous avions en effet montré que la température avait un effet positif sur la production de composés phénoliques (*cf.* paragraphe IV.3), or ici celle-ci parait au contraire avoir un rôle négatif en milieu contrôlé.

Des résultats similaires ont été obtenus pour l'espèce méditerranéenne *Cystoseira amentaceae* (Mannino *et al.*, sous presse) pour laquelle une réduction de la quantité de composés phénoliques est observée au bout de 48 h après un stress de température (élevée). Les auteurs expliquent qu'une exsudation des composés phénoliques a lieu plutôt qu'un transport de ces composés au travers du thalle comme ceci a déjà été décrit par d'autres

auteurs (Sieburth et Jensen, 1969 ; Carlson et Carlson, 1984; Jennings et Steinberg, 1994; Pavia et Toth, 2000).

Même si une augmentation de la température de l'eau de mer est généralement indicatrice d'effet négatifs sur les algues, conduisant à la mort des espèces (Breeman, 1988; Wernberg *et al*., 2011a,b; Harley *et al*., 2012), dans notre cas, les individus de *Sargassum muticum* n'ont montré aucun signe de souffrance des thalles, durant et à la fin de l'expérience (après 25 jours de culture). En revanche, au-delà de 30 jours, ceux-ci commençaient à se détériorer (perte des flotteurs,..). D'une façon générale, les algues saines et stressées sont connues pour libérer des composés dans l'eau de mer, soit par exsudation, soit par dommages cellulaires, constituant ainsi un apport en matière organique dissoute (MOD) important (Craigie et McLachlan, 1964; Sieburth et Jensen, 1969; Ragan et Jensen, 1978; Carlson et Carlson, 1984; Jennings et Steinberg, 1994; Swanson et Druehl, 2002). Néanmoins, peu de données sont disponibles sur le rôle écologique de ces exsudats (Koivikko *et al*., 2005). Ainsi, il serait intéressant d'envisager de suivre la production d'exsudats sur une culture en petit volume d'individus et ainsi prouver l'existence ou non d'exsudats chez *S. muticum*.

Les résultats obtenus dans cette expérimentation peuvent également s'expliquer par une température moyenne de 22°C plus élevée qu'en milieu naturel (moyenne de 17°C maximum sur les côtes bretonnes en été. De plus, ces résultats doivent être pris avec précautions. En effet, la température n'était pas régulière durant l'expérience. De plus, nous avions montré que l'application de différentes longueurs d'onde, UV-A/UV-B, même dans le cas de PAR, provoquait à elle seule une variation de la teneur en CP. Les données HRMAS à venir devrait aider à conclure sur ce point.

IV.4.4.3. Limitations et solutions envisagées

a) Gestion de l'échantillonnage :

Nos résultats ont montré qu'il est nécessaire d'augmenter la fréquence d'échantillonnage, un prélèvement journalier devrait permettre de distinguer à partir de quel moment on a réellement une augmentation sensible de la quantité de composés phénoliques dans les thalles. Une fois ce constat fait, un suivi toutes les heures permettrait de voir si des variations horaires peuvent être observées. Il a en effet été montré, dans d'autres études que les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des CP étaient activées très rapidement (moins de 24h) après le déclenchement d'un stress lumineux (E. Creis, travaux de thèse en cours). Il reste également à déterminer si de telles variations, dès quelques heures de stress lumineux, seraient visibles par simple dosage ou en RMN HR-MAS.

Dans notre étude, nous avons décidé de suivre l'évolution de la teneur en CP au sein d'un même individu pour s'affranchir des différences inter-individuelles pouvant faire varier la quantité de composés dans les thalles (*cf.* paragraphe IV.2). Cependant, les échantillons prélevés sur un même thalle au cours du temps induisent un biais dans les tests statistiques. Les données sont dépendantes les unes des autres si on considère que le prélèvement en lui-même est susceptible d'entrainer une variation de la teneur en composés phénoliques dans les

thalles. Cependant, les échantillons prélevés étaient de petite taille (3 cm) et n'étaient pas effectués consécutivement sur la même latérale. Aussi nous avons choisi de ne pas tenir compte de cette dépendance des données lors des tests statistiques. Il est d'ailleurs plutôt difficile de mesurer l'impact d'un tel prélèvement. En effet, si un tel test devait être effectué cela impliquerait évidemment le suivi d'individus différents. Il est en effet impossible de trouver des thalles rigoureusement identiques.

b) Gestion des paramètres en milieu contrôlé

Lors des expériences menées sur l'impact des UV sur la teneur totale en composés phénoliques chez *Sargassum muticum*, il n'a pas été possible de mesurer l'intensité lumineuse sous l'eau. Il serait en effet intéressant, notamment pour expliquer pourquoi les algues fixées au fond des bacs semblent moins soumises au stress lumineux, de connaitre la quantité exacte de lumière reçue en fonction de la profondeur à laquelle se trouvent les thalles. Cependant même sans cette information, la condition 'thalles libres' permet de mettre en avant cet effet protecteur de la hauteur d'eau.

Pour ce qui est de l'effet de la température, on a vu qu'il y avait probablement (effet non vérifié en RMN HR-MAS) un effet « néfaste » d'une augmentation de la température de l'eau. Ce qui viendrait confirmer les résultats d'autres études (Phillips et Towers, 1982). Mais qui ne confirme pas le constat fait sur les données du milieu naturel (*cf.* paragraphe IV.3). Cependant avec le système installé au laboratoire il est très difficile de maintenir une température constante dans les bacs, le renouvellement de l'eau apportant de l'eau très froide et le débit d'arrivée n'étant pas du tout constant (perte de charges importantes dans le système d'alimentation en eau). Un système tel que celui qui devrait être installé semble donc indispensable afin de contrôler au mieux les paramètres. Il serait également intéressant, pour valider ou non l'effet température visible de refaire la même expérience mais cette fois en diminuant la température de l'eau. Une attention toute particulière devra également être apportée aux traitements des fragments de thalles prélevés afin de pouvoir obtenir des empreintes chimiques nettes en RMN HR-MAS.

c) Autres essais à prévoir

En termes de perspectives, il serait intéressant de tester l'effet d'autres paramètres abiotiques comme l'hydrodynamisme, la quantité de nutriments ou la salinité sur la production de composés phénoliques par les algues. En effet, des études ont montré l'impact de ces paramètres environnementaux sur la production des composés phénoliques chez les algues brunes (Pedersen, 1984 ; Arnold *et al*., 1995 ; Pavia et Toth, 2000 ; Koivikko, 2005 ; Marinho-Soriano *et al*., 2006 ; Plouguerné *et al*., 2006 ; Connan et Stengel, 2011a). Par ailleurs, lors des premiers essais de mise en culture afin de déterminer les conditions propices au maintien de *S.muticum* en bacs, nous avions remarqué qu'un bullage permanent, même assez léger était très néfaste au maintien de la Sargasse. On peut donc penser que celle-ci produit des composés de défense face à ce stress.

D'autre part, des facteurs biotiques comme le broutage, la colonisation bactérienne sont particulièrement importants sur l'espace intertidal et influencent fortement la production de composés phénoliques par les algues (Steinberg, 1986 ; Steinberg et Paul, 1990). Nous pourrions également envisager de tester ces paramètres en milieu contrôlé.

IV.4.5. Conclusion

Nous avons vu, qu'il est possible, en milieu contrôlé d'étudier l'effet de paramètres environnementaux sur la production de biomolécules d'intérêt. Ce type d'expérience permet de s'affranchir des effets croisés de plusieurs paramètres afin de dégager l'effet propre à un seul stimulus (température, luminosité, salinité, ..).

Cette expérience nous a permis de renforcer les connaissances liées au comportement de *Sargassum muticum* en milieu fermé. Il est possible de maintenir cette espèce au moins un mois en bac de cultures. A condition, que plusieurs points soient respectés :

1. Faible bullage, cette espèce semblant particulièrement sensible à un trop fort hydrodynamisme (Plouguerné *et al*., 2006 et observations personnelles)

2. Les thalles peuvent être utilisés libres ou fixés même si les thalles fixés à un support peuvent être maintenus plus longtemps. Pour les thalles libres un mois et ½ est la durée maximale avant détérioration complète des latérales (perte des flotteurs,..)

Cette expérience a été très concluante puisque **dans un premier temps** nous avons vu que la teneur en CP augmentait avec le type de lumière reçu (PAR versus PAR+UV-A/UV-B) et pas seulement en présence de radiations ultraviolettes, ce qui confirme les résultats obtenus sur les populations naturelles. **Dans un deuxième temps** nous avons observé que la teneur en CP variait en fonction de la température de l'eau : positivement quand l'eau ne dépasse pas 20°C (observations en milieu naturel) et négativement au-dessus de 20°C (observation en milieu contrôlé). Concernant les deux expériences effectuées, il serait intéressant de les reproduire dans des conditions plus contrôlées. Enfin, le système de culture avec simulation des marées et débit de renouvellement de l'eau contrôlé devrait nettement améliorer la qualité des manipulations à venir rendant le contrôle des paramètres plus efficace et permettant donc l'obtention de résultats plus homogènes, plus reproductibles.

Les principaux résultats obtenus ainsi que les conclusions apportées par cette étude de Doctorat, permettant de définir les perspectives à envisager pour la suite du travail, sont résumés dans les pages ci-après.

Conclusion générale

Synthèse des principaux résultats obtenus

Le travail **pluridisciplinaire** effectué au cours de cette thèse a porté sur :

- **L'étude de différents procédés pour l'extraction éco-respectueuse et efficace des composés phénoliques chez les phéophycées.**
- **L'étude de la variabilité des macromolécules (protéines, lipides, glucides) et des pigments présents chez *Sargassum muticum* en Europe.**
- **L'étude de la variabilité des phlorotannins et de leurs activités antiradicalaires et antibactériennes chez *Sargassum muticum* en Europe**.

Ainsi, dans la première partie de ce travail (Chapitre II), l'objectif était de tester des méthodologies innovantes en matière d'extraction en utilisant trois espèces d'algues brunes (Phaeophyceae) comme algues modèles. Dans un premier temps nous avons **optimisé le protocole d'extraction solide/liquide** en nous basant sur le constat que **les différents paramètres d'extraction peuvent influer sur la teneur en composés phénoliques** extraits, ainsi que sur leurs activités biologiques (antiradicalaires et antioxydantes). Ainsi, des expérimentations ont été menées sur trois espèces d'algues brunes afin d'**estimer divers paramètres cruciaux qui influent sur le rendement d'extraction** et sur les activités antioxydantes des composés extraits. **Soucieux de trouver une méthodologie innovante d'extraction plus « verte »** pouvant remplacer l'extraction solide/liquide classique, consommatrice de solvants toxiques ne répondant pas aux normes européennes REACH et IPPC, nous avons comparé, en termes d'efficacité d'extraction, le procédé solide/liquide classiquement utilisé en laboratoire, avec des méthodes plus récentes d'extraction utilisant des solvants dans leur état supercritique ou sous forme pressurisés (CO_2 ou mélanges hydro-éthanoliques). Enfin, **nous avons étudié la possibilité d'utiliser deux procédés n'utilisant pas de solvants : l'hydrolyse enzymatique et l'extrusion en tant qu'étape préparatoire avant l'extraction**. Cette étape devait permettre de rendre les composés à extraire plus disponibles et de respecter les autres constituants en vue d'un éventuel bioraffinage. Les nombreux résultats obtenus lors de cette étude sont résumés ci-dessous.

- Nous avons pu dégager les conditions d'extraction solide/liquide permettant d'obtenir le meilleur rendement d'extraction des composés recherchés :

  Un **mélange Acétone-Eau 50 :50, 40°C, 2h a donc été sélectionné.**

- Nous avons souligné l'**intérêt de l'extraction de partage centrifuge qui permet d'obtenir** une fraction active (EC_{50} de 0.52 $mg.mL^{-1}$) et concentrée en CP (extrait composé à plus de 20% de composé phénoliques) **avec un grand rendement d'extraction**. Cette technique nécessite cependant l'emploi de solvants toxiques et sera donc utilisée à des fins analytiques uniquement.

- La comparaison avec le procédé d'extraction solide/liquide nous a permis **de sélectionner l'extraction par fluides pressurisés (PLE) employée avec un mélange Ethanol-Eau pour l'extraction de composés actifs avec une haute efficacité**. Les

composés extraits possèdent des activités antiradicalaires comparables à celles des molécules utilisées dans l'industrie (EC_{50} de 0.77 $mg.mL^{-1}$) et les extraits obtenus sont constitués à plus de 15% de composés phénoliques. En évitant l'utilisation et le retraitement de solvants organiques toxiques pour l'environnement et la santé humaine, ce processus s'inscrit dans une démarche de chimie « verte » et répond donc potentiellement aux normes européennes pour une future valorisation de ces extraits. **C'est la première fois que de tels procédés sont utilisés pour l'extraction de composés phénoliques à partir de macroalgues brunes.**

- Nous avons montré que, dans les quelques conditions testées, l'extrusion et l'hydrolyse enzymatique ne semblaient pas convenir en tant qu'étape précédant l'extraction des composés phénoliques. En revanche, l'hydrolyse a montré des performances intéressantes pour l'extraction d'autres biomolécules telles que les glucides, les protéines et les lipides par exemple, ce qui en fait une technique de choix pour un éventuel bioraffinage.

Dans la deuxième partie de ce travail (Chapitre III), nous avons décrit les variations quantitatives et qualitatives des principales macromolécules présentes chez l'espèce invasive *Sargassum muticum* en Europe. L'emploi de deux techniques analytiques, la RMN HR-MAS et la spectroscopie IR, nous a permis d'avoir une vue d'ensemble des compartiments susceptibles de subir des variations selon la position géographique d'une même espèce à large répartition. Cette étude nous a montré comment une espèce est capable de changer sa composition biochimique en fonction de son environnement et ce, afin de s'acclimater à des milieux assez différents. Un dosage chimique des différentes molécules ayant montré des variations importantes a ensuite été effectué. Ce travail a mis en évidence les effets des différents paramètres environnementaux sur les compartiments lipidique, protéique ainsi que sur les quantités de carbohydrates et de pigments. L'influence de ces paramètres sur la taille des individus de *Sargassum muticum* a également été discutée. Ainsi les principales tendances sont les suivantes :

- **Compartiment lipidique :** la teneur en lipides augmente proportionnellement avec l'intensité lumineuse. Nous corroborons les résultats présentés par d'autres auteurs quant à la richesse des macroalgues brunes en acides gras insaturés (AGI); d'autre part une **grande quantité d'acides gras monoinsaturés est retrouvée chez cette espèce.** Nous avons également vu que la quantité d'acides gras saturés varie négativement avec l'intensité lumineuse et la température ; alors que la quantité d'acides gras polyinsaturés varie positivement avec la lumière.
- **Compartiment protéique :** au sein d'un même pays, les individus provenant de sites situés près d'une zone à activité anthropique élevée contiennent davantage de protéines. Notre étude a mis en avant une corrélation positive forte entre l'intensité lumineuse reçue par les algues et leur teneur en protéines. Il existe également une corrélation négative entre la teneur en carbone inorganique dissous et la teneur en protéines.
- **Compartiment polysaccharidique :** il existe une corrélation positive entre la teneur en glucides totaux et la température de l'eau. La quantité de polysaccharides

varie négativement avec l'augmentation de la teneur en carbone inorganique dissous, ou de la salinité ; et positivement, avec l'augmentation de l'intensité lumineuse reçue par les algues.

- **Appareil photosynthétique - teneur en pigment :** la quantité totale de pigments ne varie pas sensiblement d'un pays à l'autre. Cependant la proportion de chacun des pigments varie grandement. Ainsi, du point de vue de la composition pigmentaire nous avons pu rapprocher certains pays comme la France et l'Irlande. Une grande quantité de zéaxanthine est présente dans les échantillons provenant des pays du nord du gradient. Il est cependant possible que les algues aient eu à se protéger d'intensités lumineuses plus importantes qu'à l'accoutumée pour la saison (ex. de la Norvège en période de jour perpétuel lors de l'échantillonnage).
- **Effet des paramètres environnementaux sur la taille des individus :** on observe un effet négatif de l'augmentation de la température, de la salinité ou de la teneur en CI dissous et un effet positif de l'augmentation de l'intensité lumineuse.
- Par ailleurs, **les techniques analytiques employées pour obtenir une empreinte chimique de l'algue (RMN HR-MAS et spectroscopie IR) ont également permis, pour la première fois, de distinguer les individus de *Sargassum muticum* d'après leur provenance géographique en Europe**.

Dans la dernière et troisième partie (Chapitre IV), sont décrites les variations quantitatives et qualitatives des phlorotannins chez l'espèce invasive *Sargassum muticum* sur une grande échelle spatiale, le long d'un gradient latitudinal (Norvège-Portugal). Dans un premier temps cette variabilité a été appréhendée grâce à un suivi temporel (variabilité saisonnière) et spatial (variabilités intersites) des teneurs en phlorotannins. Les variabilités intra-spécifiques et intra-individuelles, par l'effet de l'âge des thalles, du stade de développement et de la partie de l'algue considérée, sur la composition en polyphénols, ont également fait l'objet d'une étude. Après la recherche d'un protocole simple pour la semi-purification des composés phénoliques présents chez *Sargassum muticum*, le type de structures les caractérisant a pu être déterminé par des techniques de RMN à deux dimensions (2D). De plus, nous avons déterminé les activités antiradicalaire et antibactérienne des différentes fractions issues de la purification. Enfin, afin de connaitre le poids moléculaire et la répartition par classe de taille des différents composés présents dans le pool de composés phénoliques, plusieurs techniques de séparation membranaires ont été testées. Les résultats obtenus nous ont permis d'estimer la taille des composés présents dans nos extraits. Enfin, suite aux résultats obtenus sur les populations (teneur en CP chez *Sargassum muticum*), nous avons testé l'effet de l'intensité lumineuse et de la température de l'eau de mer sur la teneur en CP de *S. muticum* en milieu contrôlé. Ainsi, l'effet de chacun des paramètres a pu être apprécié isolément : les radiations UVA et UVB stimulent la production de CP alors qu'une augmentation de la température fait chuter la production de CP chez *S. muticum*.

- Nous avons mesuré l'évolution au cours du temps des teneurs en phlorotannins de *Sargassum muticum*. Ainsi, nous avons souligné la **grande plasticité saisonnière du contenu phénolique** chez cette espèce, ce qui corrobore les résultats obtenus dans des études antérieures (Le Lann, 2009).

- Nous avons mis en évidence la variabilité de la teneur en composés phénoliques et de leurs activités en fonction de la partie du thalle utilisée ainsi que de l'âge des thalles. **Ces teneurs et activités sont plus importantes dans les crampons et chez les individus adultes matures.**
- Nous avons réussi à obtenir des **fractions semi-purifiées** de CP **grâce à un protocole de purification sur colonne SPE** qui s'est avéré plus efficace que le protocole de purification liquide/liquide. **La majorité des composés phénoliques actifs ont été récupérés dans les fractions hydrométhanoliques ou méthanoliques** suivant la provenance des algues ayant servi à l'extraction.
- Ainsi, il apparaît que les teneurs en composés phénoliques évoluent de façon différente selon la provenance géographique des algues. En effet, **leur répartition par polarité est différente suivant le pays considéré**.
- Nous avons caractérisé le type de composés phénoliques produit par *Sargassum muticum*. **Il s'agit de composés de type phlorethols uniquement.** De plus nous avons d'ores et déjà mis en évidence que le même type de composé est produit par tous les individus quelles que soient leur provenance géographique sur les côtes européennes.
- Nous avons également mis en évidence l'activité **antiradicalaire des fractions enrichies en composés phénoliques**, activité qui s'avère **supérieure ou égale à celle du BHT ou du BHA**, deux antioxydants puissants couramment utilisés dans les industries agro-alimentaire et cosmétique. Ainsi, ces phlorotannins pourraient être sollicités dans la détoxication des espèces réactives de l'oxygène.
- Nous avons également mis en évidence des activités antibactériennes inhibant la croissance de trois souches marines et de trois souches terrestres. Ces activités antibactériennes pourraient donc trouver des applications en aquaculture ou en santé humaine. Les extraits bruts, selon la provenance des échantillons d'algues, ne sont pas actifs contre les mêmes souches bactériennes. Par ailleurs **ce sont des molécules plutôt apolaires qui seraient responsables de ces activités** et non pas nécessairement les composés phénoliques.
- Finalement, les essais réalisés en milieu contrôlé nous ont permis de faire trois constats sur les teneurs intra-thalles mesurées : 1) i**l est possible de maintenir la macroalgue *Sargassum muticum* en milieu contrôlé,** qu'elle soit ou non fixée à un support rocheux, **durant au moins 30 jours,** 2) un **effet positif des UV mais également de l'intensité lumineuse reçue ont été observés sur la teneur en CP, et enfin** 3) un **effet négatif d'une augmentation de la température de l'eau sur la teneur en CP a été mis en évidence.**

Perspectives

Plusieurs perspectives de recherches sont ouvertes, suite aux résultats présentés dans ce manuscrit, elles sont listées ci-dessous :

D'un point de vue écologique,

- Il serait intéressant de poursuivre le suivi écologique de *Sargassum muticum* en France. Les études portant sur une grande échelle de temps représentent en effet une précieuse source d'informations pour l'étude de la biologie des populations de cette espèce invasive.
- En Europe, afin de compléter l'étude présentée dans ce manuscrit, il serait intéressant et judicieux d'échantillonner à nouveau *S. muticum* dans les mêmes pays et sites afin de valider les tendances observées, et d'étudier les mêmes compartiments biochimiques à différentes échelles : journalière, mensuelle, saisonnière et annuelle.

En ce qui concerne l'étude des composés phénoliques, quelques points restent à approfondir :

- Nous avons expliqué à plusieurs reprises que certains composés phénoliques pouvaient être exsudés et donc ne pas être mesurés lors des nos études. Nous proposons donc d'effectuer en ce sens, les vérifications qui s'imposent afin de réellement quantifier et qualifier ce phénomène d'exsudation.
- Nous avons vu que le type de composé phénolique présent chez l'espèce *Sargassum muticum* était le même en Europe quel que soit le pays considéré. Qu'en est-il des espèces de *Sargassum* tropicales ? Il serait intéressant de savoir si les composés phénoliques produits par ces espèces sont identiques ou pas au sein du genre.

En ce qui concerne les procédés d'extraction et de purification des composés phénoliques, il est pour le moment difficile de disposer d'une fraction pure ; aussi nous proposons quelques pistes de recherche :

- Une des grandes difficultés lors de l'étude des phlorotannins est de pouvoir séparer les différents constituants du pool. Jusqu'ici, la plupart des travaux de quantification ne présentaient que des résultats de dosage d'un mélange de composés phénoliques. Il est donc nécessaire d'approfondir le protocole de purification en incluant, par exemple, des étapes de chromatographie plus fines afin de pouvoir isoler chacun des phlorotannins qui constituent les fractions enrichies.
- Il serait intéressant, lors de futures analyses, de combiner certains des procédés testés. Comme par exemple, un couplage en ligne de la SFE ou de la PLE avec des techniques analytiques comme la chromatographie liquide. Ou bien encore des combinaisons SFE/SPE permettant d'améliorer la sélectivité du processus d'extraction (Klejdus *et al*., 2009) ou d'isoler les composés cibles adsorbés sur la colonne (Haglund et Spinnel, 2012).
- On pourrait également, dans le cas de la CPE, faire intervenir successivement des étapes de CPC et d'HPLC suivi d'une visualisation en UV-MS par exemple comme

cela a déjà été expérimenté par Michel (2011). Cette méthodologie pourrait donc être testée ici comme une nouvelle approche pour la séparation et l'identification rapide de composés bioactifs naturels.

En ce qui concerne les nombreuses activités biologiques des phlorotannins, nous suggérons de rechercher d'autres types d'activités sur les fractions enrichies que nous avons pu produire.

- Il serait intéressant d'évaluer au mieux les spectres d'activités des fractions actives obtenues, avec notamment d'autres tests antioxydants *in vitro* tels que les tests TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) ou bien encore FOX (ferrous oxidation-xylenol orange) fréquemment utilisés dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques.
- Nous pourrions également tester d'autres types d'activités telles que des activités anti-inflammatoires, cytotoxiques, photoprotectricesou bien encore anti-cancéreuse.

Durant cette étude pluridisciplinaire, nous nous sommes également intéressés à différents compartiments biochimiques, **il serait intéressant d'apporter quelques précisions sur le type d'acides aminés ainsi que la quantité des différents sucres présents chez *S. muticum***. Des analyses en HPLC pourraient être lancées afin de compléter notre étude.

Enfin, nous avons vu le fort potentiel que pourraient représenter les expériences en milieu contrôlé si elles sont associées en aval à des procédés d'analyse rapide des échantillons prélevés (RMN HR-MAS, IR,..).

- Aussi, à l'avenir, des études plus poussées en conditions contrôlées (études des différents paramètres pouvant entrainer des variations du contenu biochimique en milieu naturel) permettraient de mieux comprendre comment les paramètres physicochimiques du milieu influencent la production de chacune des molécules suivies ainsi que le délai de la réponse au stress.
- On pourrait également envisager des études de marquage de certaines molécules en milieu contrôlé afin de localiser les phlorotannins dans les tissus algaux au cours d'un stress. Dans le principe il s'agirait de fournir à l'algue, en milieu contrôlé et fermé, un substrat de carbonate de calcium marqué au carbone ^{13}C afin de forcer l'algue à intégrer ce carbone marqué. Il suffirait ensuite, de prélever à différents temps des morceaux de l'algue et de suivre par RMN la translocation et l'intégration de ce carbone marqué dans les différentes molécules synthétisées. La seule limitation de ce type d'expérience provient du fait que la seule source de carbone disponible pour l'algue doit être du ^{13}C. Aucun apport de carbone non marqué ne doit être apporté au milieu.

Conclusion générale

Ce travail pluridisciplinaire réalisé chez une espèce d'algue brune modèle : *Sargassum muticum* appartenant à la famille des Sargassaceae, peut s'inscrire dans un processus de recherche de nouveaux composés à activités biologiques avérées avec d'éventuelles perspectives d'exploitation industrielle (algoraffinerie par exemple). En effet, la recherche de substances d'origine naturelle est une des voies prometteuses pour l'élaboration de nouveaux principes actifs dans l'industrie pharmaceutique. Nos travaux présentent des avancées dans la connaissance et la maîtrise des techniques d'extraction et de fractionnement de produits naturels issus de macroalgues. Ces techniques qui sont à la fois rapides, efficaces s'inscrivent d'autre part dans une démarche de chimie « verte » avec une réduction des quantités de solvants, de déchets et du temps de manipulation. De plus, comme notre étude le démontre, si l'on veut étudier les métabolites secondaires, à des fins industrielles ou non, il est indispensable de coupler les études chimiques à des études biologiques telles que des études de biologie des populations afin de mieux appréhender le fonctionnement du métabolisme, primaire et secondaire, des organismes. En effet, la majorité des métabolites, tels que les composés phénoliques, sont synthétisés en réponse aux facteurs environnementaux et selon l'âge et l'état physiologique de l'algue. Ces données écologiques sont donc indispensables afin de fournir des informations quant aux périodes de récolte à privilégier afin d'obtenir le meilleur rendement possible, mais aussi dans un souci de gestion durable de la biomasse. Les résultats obtenus permettent également d'avoir une vue d'ensemble des compartiments biochimiques soumis à variation pour une même espèce d'après son origine géographique, spécialement dans le contexte actuel du changement climatique global.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abdala Diaz RTA (2001) Fotocontrol de la acumulacion de compuestos fenolicos en algas pardas. PhD Thesis, University of Malaga, Spain, pp. 217.

Abdala Diaz RTA, Cabello-Pasini A, Pérez-Rodríguez E *et al.* (2006) Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Marine Biology* 148: 459-465.

Åberg P, Pavia H (1997) Temporal and multiple scale spatial variation in juvenile and adult abundance of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series* 158: 111-119.

Agnely M, Thiébaut D (1997) Dual-mode high-speed counter-current chromatography: retention, resolution and examples. *Journal of Chromatography A* 790: 17-30.

Aguilera J, Bischof K, Karsten U *et al.* (2002) Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. II. Pigment accumulation and biochemical defence systems against high light stress. *Marine Biology* 140: 1087-1095.

Ahn MJ, Yoon KD, Kim CY *et al.* (2006) Inhibitory activity on HIV-1 reverse transcriptase and integrase of a carmalol derivative from a brown Alga, *Ishige okamurae*. *Phytotherapy Research* 20: 711-713.

Alberte RS, Friedman AL, Gustafson DL *et al.* (1981) Lightharvesting systems of brown algae and diatoms. Isolation and characterization of chlorophyll ac and chlorophyll afucoxanthin pigment-protein complexes. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 635: 304-316.

Al-Hasan R, Ali AL, Radwan S (1990) Lipids, and their constituent fatty acids, of *Phaeocystis sp.* from the Arabian Gulf. *Marine Biology* 105: 9-14.

Amsler CD (2001) Induced defenses in macroalgae: the herbivore makes a difference. *Journal of Phycology* 37: 353-356.

Amsler CD (2012) Chemical Ecology of Seaweeds, in: Seaweed Biology, Ecological Studies. Springer-Verlag, pp. 177-188.

Amsler CD, Fairhead VA (2006) Defensive and Sensory chemical ecology of brown algae. *Advances in Botanical Research* 43: 1-91.

Anderson MR, Cardinal A, Larochelle J (1981) An alternate growth-pattern for *Laminaria longicruris*. *Journal of Phycology* 17: 405-411.

Ang PO (1986) Analysis of the vegetation structure of a *Sargassum* community in the Philippines. *Marine Ecology Progress Series* 28: 9-19.

Arenas F, Viejo RM, Fernandez C (2002) Density-dependent regulation in an invasive Seaweed: responses at plant and modular levels. *Journal of Ecology* 90: 820-829.

Arnold TM, Tanner CE, Hatch WI (1995) Phenotypic variation in polyphenolic content of the tropical brown alga *Lobophora variegata* as a function of nitrogen availability. *Marine Ecology Progress Series* 123: 177-183.

Arnold TM, Targett NM (1998) Quantifying in situ rates of phlorotannin synthesis and polymerization in marine brown algae. *Journal of Chemical Ecology* 24: 577-595.

Arnold TM, Targett NM (2002) Marine tannins: the importance of a mechanistic framework for predicting ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 28: 1919-1934.

Arnold TM, Targett NM (2003) To grow or to defend: lack of tradeoffs for brown algal phlorotannins. *Oikos* 100: 406-408.

Artan M, Li Y, Karadeniz F *et al.* (2008) Anti-HIV-1 activity of phloroglucinol derivative, 6,6′-bieckol, from *Ecklonia cava*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16: 7921-7926.

Audibert L, Fauchon M, Blanc N *et al.* (2010) Phenolic compounds in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: distribution and radical-scavenging activities. *Phytochemical analysis* 21: 399-405.

B

Bäck S, Collins JC, Russell G (1992) Comparative ecophysiology of Baltic and Atlantic *Fucus vesiculosus*. *Marine Ecology Progress Series* 84: 71-82.

Baer J, Stengel DB (2010) Variability in growth, development and reproduction of the non-native seaweed *Sargassum muticum* (Phaeophyceae) on the Irish west coast. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 90: 185-194.

Banerjee K, Ghosh R, Homechaudhuri S *et al.*(2009) Seasonal variation in the biochemical composition of red seaweed *Catenella repens* from Gangetic delta, northeast coast of India. *Journal of Earth System Science* 118: 497-505.

Barwell CJ, Blunden G, Manandhar PD *et al.* (1989) Isolation and characterization of brown algal polyphenols as inhibitors of x-amylase, lipase and trypsin. *Journal of Applied Phycology* 1: 319-323.

Bazes A, Silkina A, Douzenel P *et al.* (2008) Investigation of the antifouling constituents from the brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Journal of Applied Phycology* 21: 395-403.

Bellessort B, Migniot C (1987) Côtes de la Manche et de l'Atlantique, de la Baie du Mont-Saint-Michel à la frontière espagnole. Partie A: de la Baie du Mont-Saint-Michel à la Loire. Dans: Bellessort B, Migniot C (eds) Catalogue sédimentologique des côtes françaises, Paris, pp. 559.

Belsher T (1991) *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt sur le littoral français. Synthèse des études 1983-1989. Rapport IFREMER, Brest, pp. 99.

Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M *et al.* (2008) Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry* 106: 132-139.

Berthod A, Hassoun M, Harris G (2005a) Using the Liquid Nature of the Stationary Phase: The Elution-Extrusion Method. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 28: 1851-1866.

Berthod A, Hassoun M, Ruiz-Angel M (2005b) Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 383: 327-340.

Berthomieu C, Hienerwadel R (2009) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis Research* 101: 157-170.

Berzin F, Hu GH (2004) Procédés d'extrusion réactive. Techniques de l'Ingénieur, AM3654.

Bessiere Y (2005) Filtration frontale sur membrane : mise en évidence du volume filtré critique pour l'anticipation et le contrôle du colmatage. Génie des Procédés et de l'Environnement, Universite Paul Sabatier, Toulouse II, pp. 1-204.

Bhatnagar I, Kim SK (2010) Marine Anti-tumor Drugs: Status, Shortfalls and Strategies. *Marine Drugs* 8: 2702-2720.

Bidigare R, Van Heukelem L, Trees C (2005) Algal culturing techniques in Analysis of algal pigments by High-Performance Liquid Chromatography. Andersen, R. (ed.) Elsevier Academic Press, pp. 327-345.

Black WAP (1954) Concentration gradients and their significance in *Laminaria saccharina* (L.) Lamour. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 33: 49-60.

Black WAP, Dewar ET (1949) Correlation of some of the physical and chemical properties of the sea with the chemical constitution of the algae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 28: 673-699.

Black WAP, Dewar ET, Woodward FN (1952) Manufacture of algal chemicals .4. Laboratory-scale isolation of fucoidin from brown marine algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 3: 122-129.

Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA *et al.* (2013) Marine natural products. *Natural Product Reports* 30: 237-323.

Boalch GT, Potts GW (1977) The first occurrence of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt in the Plymouth area. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 57: 29-31.

Boettcher A, Targett N (1993) Role of polyphenolic molecular size in reduction of assimilation efficiency in *Xiphister mucosus*. *Ecology*: 891-903.

Borges ME, Tejera RL, Díaz L *et al.* (2012) Natural dyes extraction from cochineal (*Dactylopius coccus*). New extraction methods. *Food Chemistry* 132: 1855-1860.

Borrás Linares I, Arráez-Román D, Herrero M *et al.* (2011) Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time. *Journal of chromatography A* 1218: 7682-7690.

Bourgougnon N, Stiger-Pouvreau V (2011) Chapter 4: Chemodiversity and bioactivity within red and brown macroalgae along the French coasts, metropole and overseas departements and territories. Dans: Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology (ed S-K Kim), pp. 58-105.

Bousquet O, Sellier N, Goffic F (1994) Characterization and Purification of Polyunsaturated Fatty Acids from Microalgae by Gas Chromatography-mass Spectrometry and Countercurrent chromatography. *Chromatographia* 39: 40-44.

Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Breeman AM (1988) Relative importance of temperature and other factors in determining geographic boundaries of seaweeds. Experimental and phonological evidence. *Helgolander Meeresunters* 42:199-241.

Breton F, Cérantola S, Ar Gall E (2011) Distribution and radical scavenging activity of phenols in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 399: 167-172.

C

Cabioc'h J, Floc'h JY, Le Toquin A, *et al.* (2006) Guide des algues des mers d'Europe. Delachaux et Niestlé SA, Paris, pp. 272.

Cabrita MT, Vale C, Rauter AP (2010) Halogenated compounds from marine algae. *Marine Drugs* 8: 2301-2307.

Cakmak T, Angun P, Demiray YE *et al.* (2012) Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering* 109: 1947-1957.

Camel V (2001) Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst* 126: 1182-1193.

Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP *et al.* (2007) Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 146: 60-78.

Carlson DJ, Carlson ML (1984) Reassessment of exudation by fucoid macroalgae. *Limnology and Oceanography* 29: 1077-1087.

Carreto JI, Carignan MO (2011) Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Marine drugs* 9: 387-446.

Cerantola S, Breton F, Ar Gall E *et al.* (2006) Co-occurence and antioxidant activities of fucol and fucophlorethol classes of polymeric phenols in *Fucus spiralis*. *Botanica Marina* 49: 347-351.

Chabeaud A, Vandanjon L, Bourseau P *et al.* (2009) Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: Application to the refining of bioactive peptidic fractions. *Separation and purification technology* 66: 463-471.

Chandini SK, Ganesan P, Bhaskar N (2008) In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chemistry* 107: 707-713.

Chapman ARO, Craigie JS (1977) Seasonal growth in *Laminaria longicruris*: relations with dissolved inorganic nutrients and internal reserves of nitrogen. *Marine Biology* 40: 161-164.

Chemat F (2011) Eco-extraction du végétal : procédés innovants et solvants alternatifs. Paris: Dunod, pp. 289-319.

Chen F, Li HB, Wong RNS *et al.* (2005) Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga Microcystis aeruginosa by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 1064: 183-186.

Chen Y, Yan X, Fan X (1997) A Hypothesis on Phaeophyceae Polyphenols: Their Structral Unit and Mechanism of the Formation. *Oceanologia et Limnologia Sinica* 28: 225-232.

Chew YL, Lim YY, Omar M *et al.* (2008) Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT - Food Science and Technology* 41: 1067-1072.

Chua MT, Tung YT, Chang ST (2008) Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*, *Bioresource Technology* 99: 1918-1925.

Chung HY, Ma WCJ, Ang PO *et al.* (2003) Seasonal variations of bromophenols in brown algae (*Padina arborescens*, *Sargassum siliquastrum* and *Lobophora variegata*) collected in Hong Kong. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2619-2624.

Coates J (2006) Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. Dans: Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 10815-10837.

Cock JM, Sterck L, Rouzé P *et al.* (2010) The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature* 465: 617-621.

Coleman RA, Ramchunder SJ, Moody AJ *et al.* (2007) An enzyme in snail saliva induces herbivore-resistance in a marine alga. *Functional Ecology* 21: 101-106.

Collén J, Davison IR (2001) Seasonality and thermal acclimation of reactive oxygen metabolism in *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 37: 474-481.

Colonna P, Della Valle G (1994) La Cuisson-Extrusion. Editions Lavoisier Tec&Doc, Paris, pp. 495.

Connan S (2004) Etude de la diversité spécifique des macroalgues de la pointe de la Bretagne et analyse des composés phénoliques des Phéophycées dominantes. Biologie. Sciences, Brest-Plouzané, pp. 1-265.

Connan S, Delisle F, Deslandes E *et al.* (2006) Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Botanica Marina* 49: 39-46.

Connan S, Deslandes E, Ar Gall E (2007) Influence of day–night and tidal cycles on phenol content and antioxidant capacity in three temperate intertidal brown seaweeds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 349: 359-369.

Connan S, Goulard F, Stiger V *et al.* (2004) Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Botanica Marina* 47: 410-416.

Connan S, Stengel DB (2011a) Impacts of ambient salinity and copper on brown algae: 1. interactive effects on photosynthesis, growth, and copper accumulation. *Aquatic Toxicology* 14: 94-107.

Connan S, Stengel DB (2011b) Impacts of ambient salinity and copper on brown algae: 2. interactive effects on phenolic pool and assessment of metal binding capacity of phlorotannin. *Aquatic Toxicology* 14: 1-13.

Contreras L, Moenne A, Gaillard F *et al.* (2010) Proteomic analysis and identification of copper stress-regulated proteins in the marine alga *Scytosiphon gracilis* (Phaeophyceae). *Aquatic Toxicology* 96: 85-89.

Coppejans E (1995) Flore algologique des côtes du Nord de la France et de la Belgique. Jardin Botanique National de Belgique, Fascicule special, pp. 1-69.

Cox S, Abu-Ghannam N, Gupta S (2010) An Assessment of the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Six Species of Edible Irish Seaweeds. *International Food Research Journal* 17: 205-220.

Craigie JS (1990) Cell walls. In Cole K. M. & Sheath R. G. (eds), Biology of the Red Algae, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 221–257.

Craigie JS, McLachlan J (1964) Excretion of colored ultra-violet-absorbing substances by marine algae. *Canadian Journal of Botany* 42: 23-33.

Cravotto G, Boffa L, Mantegna S *et al.* (2008) Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry* 15: 898-902.

Critchley AT (1989) The establishment and increase of Sargassum muticum (Yendo) Fensholt populations within the SoIent area of Southern Britain.2. An investigation of the increase in canopy cover of the alga at low water. *Botanica Marina* 26: 182-258.

Critchley AT, Farnham WF, Morelle S (1983) A chronology of new European sites of attachments of the invasive brown alga, *Sargassum muticum*, 1973-1981. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 63: 799-811.

Cruz-Rivera E, Hay M (2001) Macroalgal traits and the feeding and fitness of an herbivorous amphipod: the roles of selectivity, mixing, and compensation. *Marine Ecology Progress Series* 218: 249-266.

Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME *et al.* (2007) A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds*, Glycobiology* 17: 541-542.

Curiel D, Bellemo G, Marzocchi M *et al.* (1998) Distribution of introduced Japanese macroalgae *Undaria pinnatifida*, *Sargassum muticum* (Phaeophyta) and *Antithamnion pectinatum* (Rhodophyta) in the Lagoon of Venice. *Hydrobiologia* 385: 17-22.

D

Davison IR (1987) Adaptation of photosynthesis in Laminaria saccharina (Phaeophyta) to changes in growth temperature. *Journal of Phycology* 23: 273-283.

Davison IR (1991) Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *Journal of Phycology* 27: 2-8.

Dawczynski C, Schubert R, Jahreis G (2007) Amino acids, fatty acids and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry* 103: 891-899.

De la Coba F, Aguilera J, Figueroa FL *et al.* (2009) Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *Journal of Applied Phycology* 21: 161-169.

De Martino A, Douady D, Quinet-Szely M, *et al.* (2000) The light-harvesting antenna of brown algae. *European Journal of Biochemistry* 267: 5540-5549.

De Paula EJ, De Oliveira ECF (1982) Wave exposure and ecotypical differentiation in *Sargassum cymosum* (Phaeophyta Fucales). *Phycologia* 21: 145-153.

De Reviers B (2003a) Biologie et Phylogenie des algues, tome 1. Edition Belin, Paris, pp. 255.

De Reviers B (2003b) Biologie et Phylogenie des algues, tome 2. Edition Belin, Paris, pp. 255.

Deal MS, Hay ME, Wilson D *et al.*(2003) Galactolipids rather than phlorotannins as herbivore deterrents in the brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Oecologia* 136: 107-114.

Dean AP, Sigee DC, Estrada B *et al.* (2010) Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology* 101: 4499-4507.

Decker EL, Frank W, Sarnighausen E *et al.* (2006) Moss systems biology en route: phytohormones in *Physcomitrella* developement. *Journal of Plant Biology (Stuttgart)* 8: 397-406.

Delannay E, Toribio A, Boudesocque L *et al.* (2006) Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications. *Journal of Chromatography A* 1127: 47-51.

Demmig-Adams B, Adams WW (1992) III. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 43: 599-626.

Demmig-Adams B, Adams WW (1996) III. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. Trends in Plant Science 1: 21-26.

Denton A, Chapman ARO, Markham J (1990) Size-specific concentrations of phlorotannins (anti-herbivore compounds) in three species of *Fucus*. *Marine Ecology Progress Series* 65: 103-104.

Desmoulin F, Bon D, Martino R *et al.* (2008) M. Étude critique de l'utilisation de la RMN HRMAS pour l'analyse des tissus biologiques. *Comptes Rendus Chimie* 11: 423- 433.

Destandau E, Toribio A, Lafosse M *et al.* (2009) Centrifugal partition chromatography directly interfaced with mass spectrometry for the fast screening and fractionation of major xanthones in *Garcinia mangostana*. *Journal of Chromatography A* 1216: 1390-1394.

Di Masi J, Grabowski H, Vernon J (1995) R&D costs, innovative output and firm size in the pharmaceutical industry. *International Journal of the Economics of Business* 2: 201-219.

Dicke M, Hilker M (2003). Induced plant responses: from molecular to evolutionary biology. *Journal of Basic and Applied Ecology* 4: 3-14.

Dittami S, Scornet D, Petit J *et al.* (2009) Global expression analysis of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) reveals large-scale reprogramming of the transcriptome in response to abiotic stress. *Genome Biology* 10: R66.

Dizerbo A, Herpe E (2007) Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la Manche et l'Atlantique, îles Anglo-normandes incluses. Anaximandre, Edition scientifiques, pp. 315.

Doner LW, Whistler RL (1973). Fucoidan in Industrial Gums, R. L. Whistler(Ed.). New York, Academic Press, pp. 115-121.

Dos Santos AO, Veiga-Santos P, Ueda-Nakamura T *et al.* (2010) Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. *Marine drugs* 8: 2733-2743.

Drew EA (1983) Physiology of Laminaria. II. Seasonal variation of photosynthesis and respiration in *Laminaria digitata* Lamour., *L. hyperborea* (Gunn.) Fosl. and *L. saccharina* (L.) Lamour. and a model for calculation of annual carbon budgets. *Marine Ecology* 4: 227-250.

Dring MJ (2006) Stress resistance and disease resistance in seaweeds: the role of reactive oxygen metabolism. *Advances in Botanical Research* 43: 175-207.

Dring MJ, Lüning K (1994) Influence of spring-neap tidal cycles on the light available for photosynthesis by benthic marine plants. *Marine Ecology Progress Series* 104: 131-137.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK *et al.* (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.

Durako MJ, Dawes CJ (1980) A comparative seasonal study of two populations of *Hypnea musciformis* from the east and west coasts of Florida, USA. I. Growth and chemistry. *Marine Biology* 59: 151-156.

E

Edwards KF, Pfister CA, Van Alstyne KL (2006). Nitrogen content in the brown alga *Fucus gardneri* and its relation to light, herbivory and wave exposure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 336: 99-109.

El-Naggar MEE (1994) Effect of different environmental factors on the major chemical constituents of some marine algae. *Journal of Marine Science* 5: 91-105.

Engelen A, Espirito-Santo C, Simoes T *et al.* (2008) Periodicity of propagule expulsion and settlement in the competing native and invasive brown seaweeds, *Cystoseira humilis* and *Sargassum muticum* (Phaeophyta). *European Journal of Phycology* 43: 275-282.

Ensminger I, Foerster J, Hagen C *et al.* (2005) Plasticity and acclimatation to light reflected in temporal and spatial changes of small-scale macroalgal distribution in a stream. *Journal of Experimental Botany* 56: 2047-2058.

F

Fairhead VA, Amsler CD, McClintock JB *et al.* (2005) Variation in phlorotannin content within two species of brown macroalgae (*Desmarestia anceps* and *D. menziesii*) from the Western Antarctic Peninsula. *Polar Biology* 28: 680-686.

Fairhead VA, Amsler CD, McClintock JB *et al.* (2006) Lack of defense or phlorotannins induction by UV radiation or mesograzers in *Desmarestia anceps* and *D. meniesii* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 42: 1174-1183.

Falkowski G, Raven JA (2007) Aquatic photosynthesis. 2nd ed. Princeton and Oxford: Princeton University Press., pp. 512.

Fan D, Hodges DM, Zhang J *et al*. (2011) Commercial extract of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* enhances phenolic antioxidant content of spinach (*Spinacia oleracea L*) which protects *Caenorhabditis elegans* against oxidative and thermal stress. *Food Chemistry* 124: 195-202

Farnham WF (1980) Studies on Aliens in the Marina Flora of Southern England. *The shore environment* 2: 874-913.

Ferry JD (1936) Statistical evaluation of sieve constants in ultrafiltration. *Journal of General Physiology* 20: 95-104.

Fichaut B, Suanez S (2008) Le rechargement de la plage de Sainte-Anne-du-Portzic (Brest-Finistère) : quand la recherche fondamentale se met au service d'une gestion cohérente du littoral. *Norois* 208: 1-17.

Figueroa FL, Israel A, Neori A *et al.* (2010) Effect of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation to short-term stress (UV radiation) in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Marine Pollution Bulletin* 60: 1768-1778.

Fletcher RL, Fletcher SL (1975) Studies on the recently introduced brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. I. Ecology and reproduction. *Botanica marina* 18: 149-156.

Fleurence J (1999) Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science and Technology* 10: 25-28.

Fleurence J, Gutbier G, Mabeau S *et al.* (1994) Fatty acids from 11 marine macro-algae of the French Brittany coast. *Journal of Applied Phycology* 6: 527-532.

Floc'h JY (1964) Distribution verticale et écologie des algues marines sur les côtes bretonnes. *Penn Ar Bed* 4:182-190.

Floc'h JY (1967) Cartographie de la vegetation marine et observations écologiques dans l'archipel de Molène (Finistère). Thèse de 3ème cycle, Faculté des Sciences, Université de Rennes, pp. 135.

Flodin C, Whitfield FB (1999) 4-hydroxybenzoic acid: a likely precursor of 2,4,6-tribromophenol in *Ulva lactuca*. P*hytochemistry* 51: 249-255.

Foucault AP (1994) Solvent systems on centrifugal partition chromatography. In Centrifugal Partition Chromatography (chromatographic science series, vol.68), Marcel Dekker, New York, pp. 71-98.

Fox LR (1981) Defense and dynamics in plant-herbivore systems. *American Zoologist* 21: 853-864.

Franks F (1998) Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45: 221-229.

Frey W, Lösch R (2010) Geobotanik: Pflanzen und Vegetation in Raum und Zeit. 3 ed, Spektrum, Heidelberg, ISBN 978-3-8274-2335-1, pp. 519.

Fukumoto LR, Mazza G (2000) Assesing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3597-3604.

G

Gagne JA, Mann KH, Chapman ARO (1982) Seasonal patterns of growth and storage in Laminaria longicruris in relation to differing patterns of availability in nitrogen in the water. *Marine Biology* 69: 91-101.

Galland-Irmouli AV, Fleurence J, Lamghari R *et al.* (1999) Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse). *Journal of Nutritional Biochemistry* 10: 353-359.

Ganesan P, Chandini SK, Bhaskar N (2008) Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology* 99: 2717-2723.

Gaylord B, Blanchette CA, Denny MW (1994) Mechanical Consequences of Size in Wave-Swept Algae. *Ecological Monographs* 64: 287-313.

Gerard VA (1984) The light environment in a giant kelp forest: influence of *Macrocystis pyrifera* on spatial and temporal variability. *Marine biology* 84: 189-195.

Gerasimenko NI, Busarova NG, Moiseenko OP (2010) Seasonal changes in the content of lipids, fatty acids, and pigments in brown alga *Costaria costata. Russian Journal of Plant Physiology* 57: 205-211.

Gévaert F, Creach A, Davoult D *et al.* (2002) Photoinhibition and seasonal photosynthetic performance of the seaweed *Laminaria saccharina* during a simulated tidal cycle: chlorophyll fluorescence measurements and pigment analysis. *Plant, Cell & Environment* 25: 859-872.

Gévaert F, Créach A, Davoult D *et al.* (2003) *Laminaria saccharina* photosynthesis measured in situ: photoinhibition and xanthophyll cycle during a tidal cycle. *Marine Ecology Progress Series* 247: 43-50.

Givernaud T (1984) Recherches sur l'algue brune *Sargassum muticum* (yendo) fensholt en Basse-Normandie. Université de Caen, pp. 72.

Glombitza KW, Forster M, EckhardtG (1978) Polyhydroxyphenyläther aus der phaeophycee *Sargassum muticum*. *Phytochemistry* 17: 579-580.

Glombitza KW, Geisler C, Eckhardt G (1977) Antibiotica aus Algen. 21. Phlorotanninvorstufen aus *Dictyota dichotoma*. *Phytochemistry* 16: 2035-2036.

Glombitza KW, Koch M, Eckhardt G (1976) Polyhydroxyphenyläther aus *Laminaria ochroleuca*. *Phytochemistry* 15: 1082-1083.

Glombitza KW, Pauli K (2003) Fucols and phlorethols from the brown alga *Scytothamnus australis* Hook. et Harv. (Chnoosporaceae). *Botanica Marina* 46: 315-320.

Glombitza KW, Rösener HU (1974) Bifuhalol: Ein diphenyläther aus *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry* 13: 1245-1247.

Gordillo FJL, Aguilera J, Jimenez C (2006). The response of nutrient assimilation and biochemical composition of Arctic seaweeds to a nutrient input in summer. *Journal of Experimental Botany* 57: 2661-2671.

Gorham J, Lewey SA (1984) Seasonal changes in the chemical composition of *Sargassum muticum. Marine Biology* 80: 103-107.

Goss R, Jakob T (2010) Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynthesis Research* 106: 103-122.

Gouveia L, Nobre BP, Marcelo FM *et al.* (2007) Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO2. *Food Chemistry* 101: 717-723.

Govindaraju V, Young K, Maudsley AA (2000) Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR in Biomedicine* 13:129-153

Gray PWG, Jones EBG (1977) The attempted clearance of *Sargassum muticum* from Britain. *Environmental Conservation* 4: 303-308.

Green D, Kashman Y, Miroz A (1993) Colpol, a new cytotoxic C6-C4-C6 metabolite from the alga *Colpomenia sinuosa*. *Journal of Natural Products* 56: 1201-1202.

Gudlavalleti CM, Szymanski HC, Jarrell DS (2006) Stephens, In vivo determination of *Neisseria meningitidis* serogroup A capsular polysaccharide by whole cell high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 341: 557-562.

Guérin T (2012) Caractérisation de souches bactériennes isolées lors de mortalités d'ormeaux européens *Haliotis tuberculata*. Rapport de stage Master 1. Institut Universitaire Européen de la Mer-UBO, pp. 1-20.

Guérin T (2013) Etude de l'activité antibactérienne d'extraits polaires et apolaires de deux macroalgues (*Palmaria plamata* et *Grateloupia turuturu*) et son intérêt en halioculture. Rapport de stage Master 2. Institut Universitaire Européen de la Mer-UBO, pp. 1-35.

Gupta S, Abu-Ghannam N (2011a) 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: 600–609.

Gupta S, Abu-Ghannam N (2011b) Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology* 22: 315-326.

Gylle AM, Nygård CA, Ekelund NGA (2009) Desiccation and salinity effects on marine and brackish Fucus vesiculosus L. (Phaeophyceae). *Phycologia* 48: 156-164.

H

Häder DP, Figueroa FL (1997) Photoecophysiology of Marine Macroalgae. *Photochemistry and Photobiology* 66: 1-14.

Haglund P, Spinnel E (2010) A modular approach to pressurized liquid extraction with in-cell clean-up. *LC GC Asia Pacific* 13: 6-12.

Hammerstrom K, Dethier NM, Duggins DO (1998) Rapid phlorotannin induction and relaxation in five Washington kelps. *Marine Ecology Progress Series* 165: 293-305.

Hamzaoui M, Hubert J, Hadj-Salem J *et al.* (2011) Intensified extraction of ionized natural products by ion pair centrifugal partition extraction. *Journal of Chromatography A* 1218: 5254-5262.

Hanelt D, Huppertz K, Nultsch W (1993) Daily course of photosynthesis and photoinhibition in marine macroalgae investigated in the laboratory and field. *Marine Ecology Progress Series* 97: 31-37.

Hardouin K, Burlot AS, Arif U *et al.* (2013) Bioactive antiviral enzymatic hydrolysates from different invasive French seaweeds. *Journal of Applied Phycology* DOI 10.1007/s10811-013-0201-6.

Harley CDG, Anderson KM, Demes KW *et al.* (2012) Effects of climate change on global seaweed communities. *Journal of Phycology* 48: 1064-1078.

Harlin MM, Craigie JS (1978) Nitrate uptake by *Laminaria longicruris* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 14: 464-467.

Harnedy PA, Fitzgerald RJ (2011) Bioactive Proteins, Peptides, and Amino Acids from Macroalgae. *Journal of Phycology* 47: 218-232.

Harrison PG, Chan AT (1980) Inhibition of the growth of micro-algae and bacteria by extracts of eelgrass (*Zostera marina*) leaves. *Marine Biology* 61: 21-26.

Harwood JL, Jones AL (1989) Lipid metabolism in algae. *Advances in Botanical Research* 16: 1-53.

Hattab ME, Culioli G, Piovetti L (2007) Comparison of various extraction methods for identification and determination of volatile metabolites from the brown alga *Dictyopteris membranacea. Journal of Chromatography A* 1143: 1-7.

Haug A, Jensen A (1956) Seasonal variation in chemical compositions of *Laminaria digitata* from different parts of the Norwegian coast. International Seaweed Symposium, Trondheim 2: 10-15.

Hay ME (1981) Spatial patterns of grazing intensity on a Caribbean barrier reef: herbivory and algal distribution. *Aquatatic Botany* 11: 97-109.

Hay ME, Fenical W (1988) Marine plant-herbivore interactions: the ecology of chemical defense. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 19: 111-145.

Hay ME, Duffy JE, Fenical W (1989) Host-plant specialization decreases predation on a marine amphipod: an herbivorein plants clothing. *Ecology* 71: 733-743.

Hellio C, Berge JP, Beaupoil C *et al.* (2002) Screening of marine algal extracts for antisettlement activities against microalgae and macroalgae. *Biofouling* 18: 205-215.

Hellio C, Marechal JP, Véron B *et al.* (2004a) Seasonal variation of antifouling activities of marine algae from the Brittany coast (France). *Marine Biotechnology* 6: 67-82.

Hellio C, Simon Colin C, Clare AS *et al.* (2004b) Anti-settlement activities of *Grateloupia turuturu* hydroalcoholic extracts on cyprids of *Balanus amphitrite*. *Biofouling* 20: 139-145.

Helm D, Labischinski H, Schallehn G *et al.* (1991) Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of General Microbiology* 137: 69-79.

Hemmi A, Honkanen T, Jormalainen V (2004) Inducible resistance to herbivory in *Fucus vesiculosus*-duration, spreading and variation with nutrient availability. *Marine ecology process series* 273: 109-120.

Hemmi A, Jormalainen V (2004) Geographic covariation of chemical quality of the host alga *Fucus vesiculosus* with fitness of the herbivorous isopod *Idotea baltica*. *Marine Biology* 145: 759-768.

Henley WJ (1990) Uncoupling of various measures of growth in *Ulva rotundata* (Chlorophyta) following a large decrease in irradiance. *Journal of Phycology* 26: 206-207.

Henley WJ, Dunton KH (1997) Effects of nitrogen supply and continuous darkness on growth and photosynthesis of the arctic kelp *Laminaria solidungula*. *Limnology and Oceanography* 42: 209-216.

Henry BE, Van Alstyne KL (2004) Effects of UV radiations on growth and Phlorotannins in *Fucus gardneri* (Phaeophyceae) juvniles and embryos. *Journal of Phycology* 40: 527-533.

Heo SJ, Jeon YJ (2009) Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 95: 101-107.

Heo SJ, Ko SC, Cha SH, *et al.* (2009) Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 23: 1123-1130.

Hernández-Carmona G, Carrillo-Domínguez S, Arvizu-Higuera D *et al.* (2009) Monthly variation in the chemical composition of *Eisenia arborea* J.E. Areschoug. *Journal of Applied Phycology* 21: 607-616.

Herrero M, Ibáñez E, Señoráns J et al. (2004) Pressurized liquid extracts from Spirulina platensis microalga. Journal of Chromatography A 1047: 195-203.

Herrero M, Arráez-Román D, Segura A *et al.* (2005) Pressurized liquid extraction–capillary electrophoresis–mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts. *Journal of Chromatography A* 1084: 54-62.

Herrero M, Cifuentes A, Ibanez E (2006) Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry* 98: 136-148.

Herrero M, Mendiola JA, Cifuentes A *et al.* (2010) Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A* 1217: 2495-2511.

Hersant C (2013) Valorisation de l'algue brune Sargassum muticum en Europe : purification, fractionnement par taille des composés phénoliques et activités antiROS associées. Stage de Master 2. Institut Universitaire Européen de la Mer-UBO, pp. 1-37.

Hily C, Raffin C, Connan S (1999) Les herbiers de zostères en Bretagne. Inventaire des sites, faune et flore. *Diren Bretagne*, pp. 57.

Honkanen T, Jormalainen V (2005) Genotypic variation in tolerance and resistance to fouling in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Oecologia* 144: 196-205.

Honkanen T, Jormalainen V, Hemmi A *et al.* (2002) Feeding and growth of the isopod Idotea baltica on the brown alga *Fucus vesiculosus*: roles of inter-population and within-plant variation in plant quality. *Ecoscience* 9: 332-338.

Honya M, Kinoshita T, Ishikawa M *et al.* (1994) Seasonal Variation in the Lipid Content of Cultured *Laminaria japonica*: Fatty Acids, Sterols, β_Carotene and Tocopherol. *Journal of Applied Phycology* 6: 25-29.

Hu J, Yang B, Lin X *et al.* (2012) Bioactive metabolites from Seaweeds. Dans: Handbook of Marine Macroalgae. Se-Kwon Kim, pp. 262-284.

Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry* 53: 1841-1856

Hurd CL (2000) Water motion, macroalgal physiology, and production. *Journal of Phycology* 36: 453-472.

Hwang H, Chen T, Nines RG *et al.* (2006) Photochemoprevention of UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by brown algae polyphenols. *International Journal of Cancer* 119: 2742-2749.

Hwang RL, Tsai CC, Lee TM (2004) Assessment of temperature and nutrient limitation on seasonal dynamics among species of *Sargassum* from a coral reef in southern Taiwan. *Journal of Phycology* 40: 463-473.

Hyvarinen M, Koopmann R, Hormi O *et al.* (2000) Phenols in reproductive and somatic structures of lichens : a case of optimal defence? *Oikos* 91: 371-375.

I

Ilvessalo H, Tuomi J (1989) Nutrient availability and accumulation of phenolic compounds in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Marine Biology* 101: 115-119.

Incera M, Olabarria C, Troncoso JS *et al.* (2009) Response of the invader *Sargassum muticum* to variability in nutrient supply. *Marine Ecological Progress Series* 377: 91-101.

Indergaard M, Minsaas J (1991) Animal and human nutrition. Dans: Guiry, M. D. & Blunden, G. (Ed.) Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 21-64.

Ioannou E, Roussis V (2009) Natural Products from Seaweeds. Dans: Plat-derived Natural Products. Osbourn A.E & Lanzotti V, pp. 51-81.

Ito Y (2005) Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. J*ournal of Chromatography A* 1065: 145-168.

J

Jaime L, Mendiola JA, Ibanez E *et al.* (2007) Beta-carotene isomer composition of sub- and supercritical carbon dioxide extracts. Antioxidant activity measurement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:10585-10590.

Jégou C, Culioli G, Kervarec N *et al.* (2010) LC/ESI-MSn and 1H HR-MAS NMR analytical methods as useful taxonomical tools within the genus *Cystoseira* C. Agardh (Fucales, Phaeophyceae). *Talanta* 83: 613-622.

Jégou C (2011) Etude du genre *Cystoseira* des côtes bretonnes: taxinomie, écologie et caractérisation de substances naturelles. Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale, pp. 310.

Jennings JG, Steinberg PD (1994) In situ exudation of phlorotannins by the sublittoral kelp *Ecklonia radiata*. *Marine Biology* 121: 349-354.

Jennings JG, Steinberg PD (1997) Phlorotannins versus other factors affecting epiphyte abundance on the kelp *Ecklonia radiata*. *Oecologia* 109: 461-473.

Jeon S, Woo M, Kim H *et al.* (2008) Antiobese effects of seaweed ethanol extract containing fucoxanthin in the C57BL/6J mice. *Journal of Clinical Lipidology* 2: 117-118.

Jephson NA, Gray PWG (1977) Aspects of the ecology of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, in the Solent region of the British Isles. I. The growth cycle and epiphytes. Dans: Biology Organisms. Proceedings of the 11th European Symposium on Marine Biology. Keegan BF, O'Ceidigh PO et Boaden PJS (Eds), Pergamon, Oxford: pp. 367-375.

Jiménez-Escrig A, Sánchez-Muniz FJ (2000) Dietary fibre from edible seaweeds : Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutrition Research* 20: 585-598.

Jimenez-Escrig A, Jimenez-Jimenez I, Pulido R *et al.* (2001) Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of the science of Food and Agriculture* 81: 530-534.

Jones AL, Harwood JL (1993) Lipid metabolism in the brown marine algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Experimental Botany* 44: 1203-1210.

Jormalainen V, Honkanen T (2001) Multiple cues for phenotypic plasticity in phlorotannin production of the bladder wrack *Fucus vesiculosus*. *Phycologia* 40: 59-60.

Jormalainen V, Honkanen T (2004) Variation in natural selection for growth and phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 807-820.

Jormalainen V, Honkanen T, Koivikko R *et al.* (2003) Induction of phlorotannin production in a brown alga: defense or resource dynamics? *Oikos* 103: 640-650.

Jung HA, Oh SH, Choi JS (2010) Molecular docking studies of phlorotannins from *Eisenia bicyclis* with BACE1 inhibitory activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry *Letters* 20: 3211–3215.

Jung WK, Heo SJ, Jeon YJ *et al.* (2009) Inhibitory effects and molecular mechanism of dieckol isolated from marine brown alga on COX-2 and iNOS in microglial cells. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57: 4439-4446.

K

Kain JM (1989) The seasons in the subtidal. *British Phycological Journal* 24: 203-215.

Kamiya M, Nishio T, Yokoyama A *et al.* (2010) Seasonal variation of phlorotannin in sargassacean species from the coast of the Sea of Japan. *Phycological Research* 58: 53-61.

Karban R, Baldwin LT (1997). Induces responses to herbivory. Chicago University Press, Chicago, pp. 319.

Karez C, Pereira R (1995) Metal contents in polyphenolic fractions extracted from the brown alga *Padina gymnospora*. *Botanica Marina* 38: 151-155.

Karlsson J (1988) *Sargassum muticum*, a new member of the algal flora of the Swedish west coast. *Svensk Botanisk Tidskrift* 82: 199-205.

Karsten U, Barrow KD, Nixdorf O *et al.* (1997) Characterization of mannitol metabolism in the mangrove red alga *Caloglossa leprieurii* (Montagne) J. Agardh. *Planta* 201: 173-178.

Kaufmann B, Christen P (2002) Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis* 13: 105-113.

Kaur C, Kapoor HC (2002) Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* 37: 153-61.

Keeling PJ, Burger G, Durnford DG *et al.* (2005) The tree of Eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 670-676.

Keyrouz R, Abasq ML, Le Bourvellec C *et al.* (2011) Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany. *Food Chemistry* 126: 831-836

Kim MK, Dubacq JP, Thomas JC *et al.* (1996) Seasonal Variation of Triacylglycerols and Fatty Acids in *Fucus serratus, Phytochemistry* 43: 49-55.

Kim MM, Ta Q Van, Mendis E *et al.* (2006) Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity. *Life sciences* 79: 1436-1443.

Kim MM, Lee SH, Kim SK (2010a) inventors; Nat Univ Pukyong Ind Univ Coop, assignee. Anti-allergy active composition containing a compound derived from *Ecklonia cava*. Korea and World patent WO2010041831.

Kim MM, Lee SH, Kim SK (2010b) inventors; Nat Univ Pukyong Ind Univ Coop, assignee. HIV-1 inhibiting pharmaceutical composition containing an *Ecklonia cava*-derived phloroglucinol polymer compound. Korea and World patent WO2010041833.

Kim SK, Kong CS (2010) Anti-adipogenic effect of dioxinodehydroeckol via AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes. *Chemico-Biological Interactions* 186: 24-29.

Kim Y, An R, Yoon N, *et al.* (2005) Hepatoprotective constituents of the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on tacrine-induced cytotoxicity in hep G2 cells. Archives of Pharmacal Research, *Pharmaceutical Society of Korea* 28: 1376-1380.

Kirschner K, Maquelin P, Pina NA *et al.* (2001) Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1763-1770.

Kirst GO (1989) Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 21-53.

Klejdus B, Kopecký J, Benesová L *et al.* (2009) Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *Journal of chromatography A* 1216: 763-771.

Koivikko R (2008) Brown algal phlorotannins: improving and applying chemical methods. Astronomica - Chemica - Physica – Mathematica, Turquie, pp.1-61.

Koivikko R, Loponen J, Honkanen T *et al.* (2005) Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *Journal of Chemical Eclogy* 31: 195-212.

Koleva II, Van Beek TA, Linssen JPH (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis* 13: 8-17.

Kornprobst JM (2006) Phaeophyceae (Algues Brunes). Dans: TEC&DOC (ed) Substances naturelles d'origine marine Chimiodiversité - Pharmacodversité - BiotechnologiesTome 1 : Généralités - Micro-organismes - Algues. Lavoisier, Londres - Paris - New York, pp. 419-499.

Kornprobst JM (2011) Encyclopedia of marine natural products. *ChemBioChem* 12: 489-490.

Kraan S (2008) *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt in Ireland: an invasive species on the move. *Journal of Applied Phycology* 20: 825-832.

Kronholm J, Hartonen K, Riekkola ML (2007) Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26: 396-412.

Kubanek J, Lester S, Fenical W *et al.* (2004) Ambiguous role of phlorotannins as chemical defenses in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Marine Ecology Progress Series* 277: 79-93.

Kübler JE, Raven JA (1996) Inorganic carbon acquisition by red seaweeds grown under dynamic light regimes. *Hydrobiologia* 326/327: 401-406.

Kuda T, Tsunekawa M, Goto H *et al.* (2005a) Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 625-633.

Kuda T, Tsunekawa M, Hishi T *et al.* (2005b) Antioxidant properties of dried 'kayamo-nori', a brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). *Food Chemistry* 89: 617-622.

Kukula-Koch W, Aligiannis N, Halabalaki M *et al.* (2013) Influence of extraction procedures on phenolic content and antioxidant activity of Cretan barberry herb. *Food chemistry* 138: 406-413.

Kumar M, Kumari P, Trivedi N *et al.* (2010) Minerals, PUFAs and antioxidant properties of some tropical seaweeds from Saurashtra coast of India. *Journal of Applied Phycology* 23: 797-810.

Kumari P, Kumar M, Gupta V *et al.* (2009) Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chemistry* 120: 749-757.

Kurhanewicz J, Swanson MG, Nelson SJ *et al.* (2002) Combined magnetic resonance imaging and spectroscopic imaging approach to molecular imaging of prostate cancer. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 16: 451-463.

L

La Barre S, Potin P, Leblanc C *et al.* (2010) The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. *Marine drugs* 8: 988-1010.

Lane AL, Stout EP, Lin AS *et al.* (2009) Antimalarial bromophycolides J–Q from the Fijian red alga *Callophycus serratus*. *Journal of Organic Chemistry* 74: 2736-2742.

Larrauri JA, Rupérez P, Saura-Calixto F (1997) Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and the anti-oxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45: 1390-1393.

Latasa M, van Lenning K, Garrido J *et al.* (2001) Losses of chlorophylls and carotenoids in aqueous acetone and methanol extracts prepared for RP-HPLC analysis of pigments. *Chromatographia, Vieweg Verlag* 53: 385-391.

Lau SCK, Qian PY (2000) Inhibitory effect of phenolic compounds and marine bacteria on larval settlement of the barnacle *Balanus amphitrite* Darwin. *Biofouling* 16: 47-58.

Le Corre P, Birrien J (1985) Conditions de formation des eaux colorées à *Gyrodinium aureolum* : Cas de la Baie de Douarnenez. Rapport UBO, Contrat Ifremer 84/3178 :61.

Le Lann K (2009) Étude de la biodiversité des Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) en milieux tempéré et tropical : écologie, chimiotaxonomie et source de composés bioactifs. Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale pp.340.

Le Lann K, Jégou C, Stiger-Pouvreau V (2008a) Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: Comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R Ross. *Phycological Research* 56: 238-245.

Le Lann K, Kervarec N, Payri CE *et al.* (2008b) Discrimination of allied species within the genus *Turbinaria* (Fucales, Phaeophyceae) using HRMAS NMR spectroscopy. *Talanta* 74: 1079-1083.

Le Lann K, Stiger-Pouvreau V (2009) Spatio-temporal phenologies of temperate *Sargassaceae*: coexistence of invasive and native species. *Phycologia* 48: 74-78.

Le Lann K, Ferret C, VanMee E et al. (2011) Total phenolic, size-fractionated phenolics and fucoxanthin contents in tropical Sargassaceae species (Fucales, Phaeophyceae) from the South Pacific Ocean: spatial and specific variability. *Phycological Research* 60 :37-50.

Le Lann K, Connan S, Stiger-Pouvreau V (2012a) Phenology, TPC and size-fractioning phenolics variability in temperate Sargassaceae (Phaeophyceae, Fucales) from Western Brittany: native versus introduced species. *Marine environmental research* 80: 1-11.

Le Lann K, Ferret C, VanMee E *et al.* (2012b) Total phenolic, size-fractionated phenolics and fucoxanthin content of tropical Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) from the South Pacific Ocean: Spatial and specific variability. *Phycological Research* 60: 37-50.

Leal PF, Kfouri MB, Alexandre FC *et al.* (2010) Brazilian Ginseng extraction via LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity. *The Journal of Supercritical Fluids* 54: 38-45.

Lee RE (1999) Phycology. Cambridge University Press, Cambridge, pp.614.

Lee HS, Lee TH, Lee JH *et al.* (2007) Inhibition of the pathogenicity of *Magnaporthe grisea* by bromophenols, isocitrate lyase inhibitors, from the red alga *Odonthalia corymbifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 6923-6928.

Leybros J, Frémeaux P (1990) Extraction solide-liquide. Aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur.* Référence J2780.

Li HB, Chen F, Zhang TY *et al.* (2001a). Preparative isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 905: 151-155.

Li HB, Chen F (2001b). Preparative isolation and purification of astaxanthin from the microalga *Chlorococcum sp.* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 925: 133-137.

Li W (2006) Multidimensional HRMAS NMR: a platform for in vivo studies using intact bacterial cells. *Analyst* 131: 777-781.

Li Y, Qian Z-J, Ryu B *et al.* (2009) Chemical components and its antioxidant properties in vitro: An edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17: 1963-1973.

Li YX, Kim SK (2011) Utilization of seaweed derived ingredients as potential anti-oxidants and functional ingredients in the food industry: An overview. *Food Science and Biotechnology* 20: 1461-1466.

Li YX, Wijesekara I, Li Y *et al.* (2011) Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry* 46: 2219-2224.

Lim YY, Murtijaya J (2007) Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. *LWT - Food Science and Technology* 40: 1664-1669.

Lim GB, Lee SY, Lee EK *et al.* (2002) Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. B*iochemical Engineering Journal* 11: 181-187.

Lim SN, Cheung PCK, Ooi VEC *et al.* (2002) Evaluation of Antioxidative Activity of Extracts from a Brown Seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3862-3866.

Lobban CS, Harrison PJ (1997) Seaweed ecology and physiology. Cambrige, Cambridge University Press, pp.359.

Loiseaux S, Rozier C (1978) Culture axénique de *Pylaiella littoralis* (L.) *Kjellm.* (Phéophycées). *Revue Algologique, Nouvelle Serie* 13: 333-340.

López A, Rico M, Rivero A *et al.* (2011) The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry* 125: 1104-1109.

López-Figueroa F (1992) Diurnal variation in pigment content in *Porphyra laciniata* and *Chondrus crispus* and its relation to the diurnal changes of underwater light quality and quantity. *Marine Ecology* 13: 285-305.

Lorraine I (1989) L'algue japonaise *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt : Caractéristiques et répartition. IFREMER, pp. 51.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL *et al.* (1951) *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

Lüder U, Clayton M (2004) Induction of phlorotannins in the brown macroalga *Ecklonia radiata* (Laminariales, Phaeophyta) in response to simulated herbivoryŕthe first microscopic study. *Planta* 218: 928-937.

Lüning K (1990) Seaweeds: Their Environment, Biogeography, and Ecophysiology. Wiley-Interscience Publication, New York, pp. 527.

Luque de Castro MD, Jiménez-Carmona MM (2000) Where is supercritical fluid extraction going? *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 19: 223-228.

M

Mabeau S, Fleurence J (1993) Seaweed in food products: bio-chemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science and Technology* 4: 103-107.

Macías-Sánchez MD, Mantell C, Rodríguez M *et al.* (2005) Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. *Journal of Food Engineering* 66: 245-251.

Maeda H, Hosokawa M, Sashima T *et al.* (2007) Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 7701-7706.

Maillard MN, Berset C (1995) Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1789-1793.

Mannino AM, Vaglica V, Cammarata M *et al.* (sous presse) Effects of temperature on total phenolic compounds in *Cystoseira amentacea* (C. Agardh) Bory (Fucales, Phaeophceae) from southern Mediterranean Sea. *Plant Biosystems*.

Marco G (1968) A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 45: 594-598.

Margraff R, Intes O, Renault JH *et al.* (2005) Partitron 25, a multi-purpose industrial centrifugal chromatograph: Rotor design and preliminary results on efficiency and stationary phase retention. *Journal of liquid chromatography and related technologies* 28: 1893-1902.

Marinho-Soriano E, Fonseca PC, Carneiro MAA *et al.* (2006) Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresource Technology* 97: 2402-2406.

Markager S, Sand-Jensen K (1992) Light requirements and depth zonation of marine macroalgae. *Marine Ecology Progress Series* 88: 83-92.

Marston A, Hostettmann K (2006) Separation and quantification of flavonoids. Dans: Andersen, ØM, Markham, KR (Eds), Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications Boca Raton: CRC Press, New York, pp. 1-36.

Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E *et al.* (1997) A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds, pp. 29-35.

Mattson WJ (1980) Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* ll: 119-161.

Mayer AMS, Rodríguez AD, Berlinck RGS *et al.* (2011) Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with anti-bacterial, anti-coagulant, anti-fungal, anti-inflammatory, anti-malarial, anti-protozoal, anti-tuberculosis, and anti-viral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 153: 191-222.

McHugh D (2003) A guide to the seaweed industry. FAO fisheries Technical Paper (FAO).

McLachlan J, Craigie JS (1964) Algal inhibition by yellow ultraviolet-absorbing substances from Fucus vesiculosus. *Canadian Journal of Botany* 42: 287-292.

Mecozzi M, Pietroletti M, Tornambe A (2011) Molecular and structural characteristics in toxic algae cultures of *Ostreopsis ovata* and *Ostreopsis spp*. evidenced by FTIR and FTNIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 78: 1572-1580.

Meiser A, Schmid-Staiger U, Trösch W (2004) Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor. *Journal of Applied Phycology* 16: 215-225.

Mello B, Petrus JCC, Hubinger MD (2010) Performance of nanofiltration concentration process in propolis extracts. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos* 30: 166-172.

Mendes RL, Fernandes HL, Coelho JP *et al.* (1995) Supercritical CO2 extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chemistry* 53: 99-103.

Mendes RL, Nobre BP, Cardoso MT *et al.* (2003) Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta* 356: 328-334.

Mendiola JA, Santoyo S, Cifuentes A *et al.* (2008a) Antimicrobial activity of sub- and supercritical CO_2 extracts of the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of Food Protection* 71: 2138-2143.

Mendiola JA, García-Martínez D, Rupérez FJ *et al.* (2008b) Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE. *Journal of Supercritical Fluids* 43: 484-489.

Michel G, Nyval-Collen P, Barbeyron T *et al.* (2006) Bioconversion of red seaweed galactans: a focus on bacterial agarases and carragenases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 23-33.

Michel T (2011) Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*), Chimie Analytique – Phytochimie, Université d'Orléans, pp. 288.

Mie G (1908) Contributions on the Optics of Turbid Media, Particularly Colloidal Metal Solutions. *Annales of Physics (Leipzig)* 25: 377-452.

Miron TL, Plaza M, Bahrim G *et al.* (2011) Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Journal of chromatography A* 1218: 4918-4727.

Miyashita K, Narayan B, Tsukui T *et al.* (2011) Brown Seaweed Lipids as Potential Source of Omega-3 PUFA in Biological Systems. Dans: Kim, S.-K. (Ed.), Handbook of Marine Macroalgae. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 329-339.

Mokrini R, Ben Mesaoud M, Daoudi M *et al.* (2008) Meroditerpenoids and derivatives from the brown alga *Cystoseira baccata* and their antifouling properties. *Journal of Natural Products* 71: 1806-1811.

Molyneux P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26: 211-219.

Moulin C, Petit A, Faugeras P et al. (1994) Procédé pour éliminer d'un extrait naturel au moins un composé organique génant. EP0613621 A2.

Mouradi-Givernaud A, Givernaud T, Morvan H *et al.* (1992) Agar from *Gelidium latifolium* (Rhodophyceae, Gelidiales): biochemical composition and seasonal variations. *Botanica Marina* 35: 153-160.

Mueller-Harvey I (2001) Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 91: 3-20.

Murakami ANN, Amboni RDMC, Prudêncio ES et al. (2011). Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. *Food Science and Technology* 44: 2211–2216.

N

N'Diaye S, Rigal L, Larocque P *et al.* (1996) Extraction of hemicelluloses from poplar, *Populus tremuloides*, using an extruder-type twin-screw reactor: a feasibility study. *Bioresource Technology* 57: 61-67.

N'Diaye S, Rigal L (2000) Factors influencing the alkaline extraction of poplar hemicelluloses in a twin-screw reactor : correlation with specific mechanical energy and residence time distribution of the liquid phase. *Bioresource Technology* 75: 13-18.

Nagai T, Inoue R, Inoue H *et al.* (2003) Preparation and antioxidant properties of water extracts of propolis. *Food Chemistry* 80: 29-33.

Nagayama K (2002) Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50: 889-893.

Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T *et al.* (2002) Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50: 889-893.

Nakai S, Inoue Y, Hosomi M (2001) Algal growth inhibition effects and inducement modes by plant-producing phenols. *Water Research* 35: 1855-1859.

Nakai M, Kagayama N, Nakahara K *et al.* (2006) Phlorotannins as radical scavengers from the extract of *Sargassum ringgoldianum*. *Marine Biotechnology* 8: 409-414.

Nakamura T, Nagayama K, Uchida K *et al.* (1996) Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fisheries Science* 62: 923-926.

Napolitano GE (1994) The relationship of lipids with light and chlorophyll measurements in freshwater algae and periphyton. *Journal of Phycology* 30: 943-950.

Naumann D, Helm D, Labischinski H (1991) Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* 351: 81-82.

Nicolas JL, Basuyaux O, Mazurie J *et al.* (2002) *Vibrio carchariae* a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases of Aquatic Organics* 50: 35-43.

Norton TA (1976) Why is *Sargassum muticum* so invasive? *British Phycological Journal* 11: 197-198.

Norton TA (1981) Gamete expulsion and release in *Sargassum muticum*. *Botanica Marina* 24: 465-470.

Norziah MH, Chio CY (2000) Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. *Food Chemistry* 68: 69-76.

O

Oka F, Oka H, Ito Y (1991) Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 538: 99-108.

Olabarria C, Rodil IF, Incera M *et al.* (2009) Limited impact of *Sargassum muticum* on native algal assemblages from rocky intertidal shores. *Marine Environmental Research* 67: 153-158.

Ong ES, Cheong JSH, Goh D (2006) Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *Journal of Chromatography A* 1112: 92-102.

Onofrejová L, Vasícková J, Klejdus B *et al.* (2010) Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51: 464-470.

Oudot-Le Secq MP (2000) Organisation et structure des génomes mitochondriaux des algues brunes *Pylaiella littoralis* et *Laminaria digitata*. Biologie, Université de Rennes I, pp. 1-166.

Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reaction prepared fromglucoseamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307-314.

P

Padilla-Gamiño JL, Carpenter RC (2007) Thermal ecophysiology of *Laurencia pacifica* and *Laurencia nidifica* (Ceramiales, Rhodophyta) from tropical and warm-temperate regions. *Journal of Phycology* 43: 686-692.

Paillard C, Leroux F, Borrego JJ (2004) Bacterial disease in marine bivalves: review of recent studies. Trends and evolution. *Aquatic Living Resources* 17: 477-498.

Parapurath SN, Bernard HE, Subramaniamc DM *et al.* (2011) A dimensional investigation on seaweeds: their biomedical and industrial applications. Dans: Handbook of Marine Macroalgae. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 532-540.

Park HY, Cho YJ, Oh KS *et al.* (2000) Application of seafood processing. Fishier Publication pp. 291-330.

Parys S, Kehraus S, Pete R *et al.* (2009) Seasonal variation of polyphenolics in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *European Journal of Phycology* 44: 331-338.

Parys S, Kehraus S, Krick A *et al.* (2010) In vitro chemopreventive potential of fucophlorethols from the brown alga *Fucus vesiculosus* L. by anti-oxidant activity and inhibition of selected cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry* 71: 221-229.

Paul VJ, Van Alstyne KL (1992) Activation of chemical defenses in the tropical green algae *Halimeda spp*. J*ournal of Experimental Marine Biology and Ecology* 160: 191-203.

Pauli GF, Pro SM, Friesen JB (2008) Countercurrent separation of natural products (review*) Journal of Natural Products* 71: 1489-1508.

Pavia H, Åberg P (1996) Spatial variation in polyphenolic content of *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyta). *Hydrobiologia* 326: 199-203.

Pavia H, Cervin G, Lindgren A *et al.* (1997) Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series* 157: 139-146.

Pavia H, Brock E (2000) Extrinsic factors influencing phlorotannin production in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Process Series* 193: 285-294.

Pavia H, Toth G (2000) Inducible chemical resistance to herbivory in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Ecology* 81: 3212-3225.

Pavia H, Toth G, Åberg P (2002) Optimal defense theory: elasticity analysis as a tool to predict intraplant variation in defenses. *Ecology* 83: 891-897.

Pavia H, Toth G, Lindgren A *et al.* (2003) Intraspecific variation in the phlorotannin content of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Phycologia* 42: 378-383.

Pedersen A (1984) Studies on phenol content and heavy metal uptake in fucoids. *Hydrobiology* 22: 498-504.

Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences 11: 1633-1644.*

Percival E, McDowell RH (1967) Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. Academic Press, London and NEW YORK, pp. 219.

Pereira RC, Costa-Lotufo LV (2012) Bioprospecting for bioactives from seaweeds: potential, obstacles and alternatives. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22: 894-905.

Perez-Rodriguez E, Aguilera J, Gomez I *et al.* (2001) Excretion of coumarins by the Mediterranean green alga *Dasycladus vermicularis* in response to environmental stress. *Marine Biology* 139: 633-639.

Phillips DW, Towers GHN (1982) Chemical ecology of red algal bromophenols. II. Exudation of bromophenols by *Rhodomela larix* (Turner) C. Agardh. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 58: 295-302.

Plaza M, Santoyo S, Jaime L *et al.* (2010) Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51: 450-455.

Plouguerné E (2006) Étude écologique et chimique de deux algues introduites sur les côtes bretonnes, *Grateloupia turuturu* Yamada et *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt : nouvelles ressources biologiques de composés à activité antifouling. Chimie Marine, Brest, pp. 251.

Plouguerné E, Le Lann K, Connan S *et al.* (2006) Spatial and seasonal variation in density, reproductive status, length and phenolic content of the invasive brown macroalga *Sargassum muticum* (Tendo) Fensholt along the coast of Western Brittany (France). *Aquatic Botany* 85: 337-344.

Plouguerné E, Hellio C, Deslandes E *et al.* (2008) Anti-microfouling activities in extracts of two invasive algae: *Grateloupia turuturu* and *Sargassum muticum. Botanica Marina* 51: 202-208.

Plouguerné E, Georgantea P, Ioannou E *et al.* (2010a) Anti-microfouling activity of lipidic metabolites from the invasive brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Marine Biotechnology* 12: 52-61.

Plouguerné E, Hellio C, Cesconetto C *et al.* (2010b) Antifouling activity as a function of population variation in *Sargassum vulgare* from the littoral of Rio de Janeiro (Brazil). *Journal of Applied Phycology* 22: 717-724.

Plouguerné E, Cesconetto C, Cruz CP *et al*. (2012) Within-thallus variation in polyphenolic content and antifouling activity in *Sargassum vulgare*. *Journal of Applied Phycology* 24: 1629-1635.

Pompeu DR, Silva EM, Rogez H (2009) Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresource technology* 100: 6076-6082.

Pörtner HO, Bennett AF, Bozinovic F *et al.* (2006) Trade-offs in thermal adaptation: the need for a molecular to ecological integration. *Physiological and Biochemical Zoology* 79: 295-313.

Potin P, Leblanc C (2006) Phenolic-based Adhesives of Marine Brown Algae Biological Adhesives, pp. 105-124.

Pouvreau JB, Morançais M, Taran F *et al.* (2008) Antioxidant and free radical scavenging properties of marennine, a blue-green polyphenolic pigment from the diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen responsible for the natural greening of cultured oysters. *Journal of Agricultur and Food Chemistry* 56: 6278-6286.

Prakash A, Rashid MA, Jensen A *et al.* (1973) Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton : diatoms. *Limnology Oceanography* 18: 516-524.

Prat L, Guiraud P, Rigal L *et al.* (2002) A one dimensional model for the prediction of extraction yields in a two phases modified twin-screw extruder. *Chemical Engineering and Processing* 41: 743-751.

R

Rabasso N (2011) Chimie organique: Généralités, études des grandes fonctions et méthodes spectroscopiques. De Boeck Supérieur, pp. 660.

Ragan MA, Craigie JS (1978) Phenolic compounds in brown and red algae. Dans: Handbook of phycological methods., Cambridge University Press, 2, pp. 157-179.

Ragan MA, Jensen A (1978) Quantitative studies on brown algal phenols. II. Seasonal variation in polyphenol content of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. and *Fucus vesiculosus* (L.). J*ournal of Experimental Marine Biology and Ecology* 34: 245-258.

Ragan MA, Glombitza KW (1986) Pholorotannins, brown algal polyphenols. Progess in Phycological Research 4: 129-241.

Ramus J, Beale SI, Mauzerall D (1976) Correlation of changes in pigment content with photosynthetic capacity of seaweeds as a function of water depth. *Marine Biology* 37: 231-238.

Ramus J, Lemons F, Zimmerman C (1977) Adaptation of light-harvesting pigments to downwelling light and the consequent photosynthetic performance of the eulittoral rockweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Marine Biology* 42: 293-303.

Rautenberger R, Bischof K (2006) Impact of temperature on UV-susceptibility of two *Ulva* (Chlorophyta) species from the Subantarctic regions. *Polar Biology* 29: 988-996.

Rebuffo CA, Schmitt J, Wenning M *et al.* (2006) Reliable and rapid identification of Listeria monocytogenes and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 994-1000.

Reddy P, Urban S (2009) Meroditerpenoids from the southern Australian marine brown alga *Sargassum fallax*. *Phytochemistry* 70: 250-255.

Rhoades DF (1979) Evolution of plant chemical defense against herbivores. Dans : (D.H. Janzen, ed.) Herbivores: their interactionwith secondar y metabolites. Academic Press, New York, pp. 3-54.

Richter G (1993) Composés phénoliques. Dans : Métabolisme des Végétaux. Physiologie et Biochimie, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, pp. 317-339.

Richter BE, Jones BA, Ezzell JL *et al.* (1996) Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry* 68: 1033-1039.

Riipi M, Haukioja E, Lempa K *et al.* (2004) Ranking of individual mountain birch tree in terms of leaf chemistry: Seasonal and anual variation. *Chemoecology* 14: 31-43.

Rinaudo M (2007) Seaweed polysaccharides. Dans: Kamerling JP, editor. Comprehensive glycoscience from chemistry to systems biology, vol 2. London: Elsevier pp. 691-735.

Rioux LE, Turgeon SL, Beaulieu M (2007) Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydrate Polymers* 69: 530-537.

Ritter A, Goulitquer S, Salaun JP *et al.* (2008) Copper stress induces biosynthesis of octadecanoid and eicosanoid oxygenated derivatives in the brown algal kelp *Laminaria digitata. New Phytologist* 180: 809-821.

Robles Medina A, Grima EM, Giménez AG *et al.* (1998) Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances* 16: 517-580.

Rodríguez-Meizoso I, Marin FR, Herrero M *et al.* (2006) Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 1560-1565.

Rodríguez-Meizoso I, Jaime L, Santoyo S *et al.* (2010) Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 51: 456-463.

Rohner C, Ward D (1997) Chemical and mechanical defense against herbivory in two sympatric species of desert Acacia. *Journal of Vegetation Sciences* 8: 717-726.

Roleda MY, Wiencke C, Van de Poll WH *et al.* (2005) Sensitivity of Laminariales zoospores from Helgoland (North Sea) to ultraviolet and photosynthetically active radiation: implications for depth distribution and seasonal reproduction. *Plant Cell and Environment* 28: 466-479.

Romanik G, Gilgenast E, Przyjazny A *et al.* (2007) Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70: 253-261.

Romeo M, Mohlenhoff B, Diem M (2006) Infrared micro-spectroscopy of human cells: Causes for the spectral variance of oral mucosa (buccal) cells. *Vibrational Spectroscopy* 42: 9-14.

Rönnberg O, Ruokolahti C (1986) Seasonal variation of algal epiphytes ans phenolic content of *Fucus vesiculosus* in a northern Baltic archipelago. *Annales Botanici Fennici* 23: 317-323.

Ruban AV, Berera R, Illioaia C *et al.* (2007) A mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature* 450: 575-578.

S

Sachindra NM, Sato E, Maeda H *et al.* (2007) Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid Fucoxanthin and its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8516-8522.

Salaün S, Kervarec N, Potin P *et al.* (2010) Whole-cell spectroscopy is a convenient tool to assist molecular identification of cultivatable marine bacteria and to investigate their adaptive metabolism. *Talanta* 80: 1758-1770.

Samarakoon K, Jeon YJ (2012) Bio-functionalities of proteins derived from marine algae-a review. *Food Research International* 48:948‑960.

Sampath-Wiley P, Neefus CD, Jahnke LS (2008) Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützing (Rhodophyta, Bangiales). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 361: 83-91.

Sanchez-Machado DI, Lopez-Cervantes J, Lopez-Hernandez J *et al.* (2004) Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry* 85: 439-444.

Sanina NM, Goncharova SN, Kostetsky EY (2008) Seasonal Changes of Fatty Acid Composition and Thermotropic Behavior of Polar Lipids from Marine Macrophytes, *Phytochemistry* 69: 1517-1527.

Sanoner P, Guyot S, Marnet N *et al.* (1999) Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica sp.*) *Journal of agricultural* and *Food Chemistry* 47: 4847-4853.

Santoyo S, Rodríguez-Meizoso I, Cifuentes A *et al.* (2009) Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae LWT-*Food Science and Technology* 42: 1213-1218.

Sastry VMVS, Rao GRK (1994) Antibacterial substances from marine algae: successive extraction using benzene, chloroform and methanol. *Botanica Marina* 37: 357-360.

Schoenwaelder MEA, Clayton MN (1998a) The secretion of phenolic compound following fertilization in *Acrocarpia paniculata* (Fucales, Phaeophyta). *Phycologia* 37: 40-46.

Schoenwaelder MEA, Clayton MN (1998b) Secretion of phenolic substances into the zygote wall and cell plate in embryos of *Hormosira* and *Acrocarpia* (Fucales, Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 34: 969-980.

Schoenwaelder MEA, Clayton MN (1999) The presence of phenolic compounds in isolated cell walls of brown algae. *Phycologia* 38: 161-166.

Schoenwaelder MEA, Wiencke C (2000) Phenolic compounds in the embryo development of several northern hemisphere fucoids. *Plant Biology* 2: 24-33.

Schoenwaelder MEA (2002) The occurence and cellular significance of physodes in brown algae. *Phycologia* 41: 125-139.

Shibata T, Ishimaru K, Kawaguchi S *et al.* (2008) Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae. *Journal of Applied Phycology* 20: 705-711.

Shim SY, Choi JS, Byun DS (2009) Inhibitory effects of phloroglucinol derivatives isolated from *Ecklonia stolonifera* on Fc"RI expression. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 4734-4739.

Shin HC, Hwang HJ, Kang KJ *et al.* (2006) An antioxidative and anti-inflammatory agent for potential treatment of osteoarthritis from *Ecklonia cava. Archives of Pharmaceutical Research* 29: 165-171.

Shintu L, Caldarelli S (2006) Toward the determination of the geographical origin of Emmental(er) cheese via high resolution MAS NMR: a preliminary investigation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54: 4148-4202.

Shintu L, Caldarelli S, Franke BM (2007) Selection of molecular markers for the geographic origin of dried beef meat by HR-MAS NMR spectroscopy. *Meat Science* 76: 700-707.

Sieburth JM, Conover JT (1965) *Sargassum* tannin, an anti-biotic which retards fouling. *Nature* 208: 52-53.

Sieburth JM, Jensen A (1969) Studies on algal substances in the sea. III. The production of extracellular organic matter by littoral marine algae. *Journal of Eperimental Marine Biology and Ecology* 3: 290-309.

Singh IP, Bharate SB (2006) Phloroglucinol compounds of natural origin. *Natural Product Reports* 23: 558-591.

Sinha RP, Singh SP, Häder DP (2007) Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 89:29-35.

Sithranga Boopathy N, Kathiresan K (2010) Anti-cancer Drugs from Marine Flora: An Overview. *Journal of Oncology* 1-18.

Sparr Eskilsson C, Björklund E (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* 902: 227-250.

Spraul M, Braumann U, Renault JH *et al.* (1997) Nuclear magnetic resonance monitoring of centrifugal partition chromatography in pH-zone-refining mode. *Journal of Chromatography A* 766: 255-260.

Soto ML, Moure A, Dominguez H *et al.* (2011) Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. *Journal of food engineering* 105: 1-27.

Souchet N (2004). Étude de l'influence de la période de récolte de l'algue brune *Laminaria longicruris* sur sa composition en polysaccharides bioactifs. Mémoire de maîtrise, Université Laval, Québec, pp. 80.

Staehr PA, Wernberg T (2009) Physiological responses of *Ecklonia radiata* (Laminariales) to a latitudinal gradient in ocean temperature. *Journal of Phycology* 45: 91-99.

Stehfest K, Toepel J, Wilhelm C (2005) The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 717-726.

Steinberg PD (1986) Chemical defenses and the susceptibility of tropical brown algae to herbivores. *Oecologia* 69: 628-630.

Steinberg PD (1989) Biogeographical variation in brown algal polyphenolics and other secondary merabolites: comparision between temperate Australasia and North America. *Oecologia* 78: 373-382.

Steinberg PD, Paul VJ (1990) Fish feeding and chemical defenses of tropical brown algae in Western Australia. *Marine Ecology Progress Series* 58: 253-259.

Steinberg PD (1992) Geographical variation in the interaction between marine herbivores and brown algal secondary metabolites. Dans: Paul VJ (ed) Ecological roles of marine natural products. Comstock Publishing Associates, Ithaca, New York, pp. 51-92.

Steinberg PD (1995) Seasonal variation in the relationshipbetween growth rate and phlorotannin production in the kelp *Ecklonia radiata*. *Oecologia* 102: 169-173.

Steinberg PD, Estes JA, Winter FC (1995) Evolutionary consequences of food chain length in kelp forest communities. *Proceedings of national Academy of Sciences USA* 92: 8145-8148.

Steneck RS, Graham MH, Bourque BJ *et al.* (2002) Kelp forest ecosystems: biodiversity, stability, resilience and future. *Environmental Conservation* 29: 436-459.

Stengel D, Dring M (1998) Seasonal variation in the pigment content and photosynthesis of different thallus regions of *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyta) in relation to position in the canopy. *Phycologia* 37: 259-268.

Stengel D, Connan S, Popper Z (2011) Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances* 29: 483-501.

Stiger V, Payri CE (1999a) Spatial and seasonal variations in the biological characteristics of two invasive brown algae, *Turbinaria ornata* (Turner) Agardh and *Sargassum mangarevense* (Grunow) Setchell (Sargassaceae, Fucales) spreading on the reefs of Tahiti (French Polynesia). *Botanica Marina* 42: 295-306.

Stiger V, Payri CE (1999b) Spatial and temporal patterns of settlement of the brown macroalgae *Turbinaria ornata* and *Sargassum mangarevense* in a coral reef on Tahiti. *Marine Ecology Progress Series* 191: 91-100.

Stiger V, Horguchi T, Yoshida T *et al.* (2000) Phylogenetic relationships of *Sargassum* (Sargassaceae, Phaeophyceae) with reference to a taxonomic revision of the section Phyllocystae based on ITS-2 nr DNA seqences. *Phycological Research* 48: 251-260.

Stiger V, Horiguchi T, Yoshida, T *et al.* (2003) Phylogenetic relationships within the genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae), inferred from ITS-2 nrDNA, with an emphasis on the taxonomic subdivision of the genus. *Phycological Research* 51: 1-10

Stiger V, Deslandes E, Payri CE (2004) Phenolic contents of two brown algae, *Turbinaria ornata* and *Sargassum mangarevense* on Tahiti (French Polynesia): interspecific, ontogenic and spatio-temporal variations. *Botanica Marina* 47: 402-409.

Sukenik A, Carmeli Y, Berner T (1989) Regulation of Fatty Acid Composition by Irradiance Level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis sp. Journal of Phycology* 25: 686-692.

Sutherland IA, Audo G, Bourton E et al. (2008) Rapid linear scale-up of a protein separation by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A* 1190: 57- 62.

Swanson AK, Druehl LD (2002) Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. Aquatic Botany 73: 241-253.

T

Taamalli A, Arráez-Román D, Barrajón-Catalán E *et al.* (2012) Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 50: 1817-1825.

Takagi T, Asahi M, Itabashi Y (1985) Fatty acid composition of twelve algae from Japanese waters. *Yukagaku* 34: 1008-1012.

Tanniou A, Serrano León E, Vandanjon L *et al.* (2013a) Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model. *Talanta* 104: 44-52.

Tanniou A, Vandanjon L, Incera M *et al.* (2013b) Assessment of the spatial variability of phenolic contents and associated bioactivities in the invasive *Sargassum muticum* sampled along its European range from Norway to Portugal. *Journal of Applied Phycology* DOI 10.1007/s10811-013-0198-x.

Tanniou A, Vandanjon L, Gonçalves O *et al.* (2014) Rapid geographical differentiation of the European spread brown macroalga *Sargassum muticum* using HRMAS NMR and Fourier-Transform Infrared spectroscopy. *Talanta* DOI 10.1016/j.talanta.2014.09.002.

Targett NM, Coen LD, Boettcher AA *et al.* (1992) Biogeographic comparisons of marine algal polyphenolics : evidence against a latitudinal trend. *Oecologia* 89: 464-470.

Targett NM, Boettcher AA, Targett TE *et al.* (1995) Tropical marine herbivore assimilation of phenolic-rich plants. *Oecologia* 103: 170-179.

Targett N, Arnold T (2001) Effects of secondary metabolites on digestion in marine herbivores. Dans: McClintock JB, Baker BJ (eds) Marine chemical ecology. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 391-411.

Teo CC, Tan SN, Yong JWH *et al.* (2010) Pressurized Hot Water Extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A* 1217: 2484-2494.

Terasaki M, Hirose A, Narayan B *et al.* (2009) Evaluation of recoverable functional lipid components of several brown seaweeds (Phaeophyta) from Japan with special references to fucoxanthin and fucosterol contents. *Journal of Phycology* 45: 974-980.

Tierney MS, Croft AK, Hayes M (2010) A review of anti-hypertensive and anti-oxidant activities in macroalgae. *Botanica Marina* 53: 387-408.

Toor RK, Savage GP (2006) Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes. *Food Chemistry* 94: 90-97.

Toribio A, Destandau E, Elfakir C *et al.* (2009) Hyphenation of centrifugal partition chromatography with electrospray ionization mass spectrometry using an active flow-splitter device for characterization of flavonol glycosides. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 23: 1863-1870.

Torres M, Niell FX, Figueroa FL (1995) Photosynthetic metabolism and cell-wall polysaccharide accumulation in *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Born. Et Thur. underdifferent light qualtities. *Journal of Applied Phycology* 7: 167-174.

Toth GB, Pavia H (2000a) Lack of phlorotannin induction in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* in response to increased copper concentrations. *Marine ecology process series* 192: 119-126.

Toth GB, Pavia H (2000b) Water-borne cues induce chemical defense in a marine alga (*Ascophyllum nodosum*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 14418-14420.

Toth GB, Pavia H (2001) Removal of dissolved brown algal phlorotannins using insoluble polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). *Journal of Chemical Ecology* 27: 1899-1910.

Toth GB, Pavia H (2002) Lack of phlorotannin induction in the kelp *Laminaria hyperborea* in response to grazing by two gastropod herbivores. *Marine Biology* 140: 403-409.

Toth GB, Langhamer O, Pavia H (2005) Inducible and constitutive defenses of valuable seaweed tissues: consequences for herbivore fitness. *Ecology* 86: 612-618.

Tugwell S, Branch G (1989) Differential polyphenolic distribution among tissues in the kelps *Ecklonia maxima*, *Laminaria pallida* and *Macrocystis angustifolia* in relation to plant-defence theory. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 129: 219-230.

V

Van Alstyne KL, Paul VJ (1990) The biogeography of polyphenolic compounds in marine macroalgae: temperate brown algal defenses deter feeding by tropical herbivorous fishes. *Oecologia* 84: 158-163.

Van Alstyne KL, Ehlig JM, Whitman SL (1999a) Feeding preferences for juvenile and adult algae depend on algal stage and herbivore species, pp. 179-185.

Van Alstyne KL, McCarthy JJ, Hustead CL *et al.* (1999b) Geographic variation in polyphenolic levels of Northeastern Pacific kelps and rockweeds. *Marine Biology* 133: 371-379.

Van Alstyne KL, Whitman SL, Ehlig JM (2001) Differences in herbivore preferences, phlorotannin production, and nutritional quality between juvenile and adult tissues from marine brown algae. *Marine Biology* 139: 201-210.

Van den Hoek C (1978) The possible significance of long-range dispersal for the biogeography of seaweeds. *Helgoländer Meersunters* 41: 261-272.

Van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM (1995) Algae - an introduction to phycology. Cambridge, Cambridge University Press, pp. 614.

Vauchel P (2007) Optimisation de procédés innovants pour l'obtention de phycocolloides. Mécanique, thermique et genie civil, Université de Nantes, pp. 1-156.

Vic L (2012) Optimisation du protocol d'extraction et purification des composes phénoliques chez l'algue brune *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt en Europe. Rapport de stage Master 1. Institut Universitaire Européen de la Mer-UBO, pp. 1-20.

Viejo RM, Arrontes J, Andrew NL (1995) An experimental evaluation of the effecy of wave action on the distribution of *Sargassum muticum* in Northern Spain. *Botanica Marina* 38: 437-441.

Villalard-Bohnsack M, Harlin MM (2001) The appearance of *Grateloupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta) on the northeast coast of north Africa. *Phycologia* 36: 372-380.

Vinatoru M, Toma M, Radu O *et al.* (1997) The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry* 4: 135-139.

W

Wagner H, Liu Z, Langner U *et al.* (2010) The use of FTIR spectroscopy to assess quantitative changes in the biochemical composition of microalgae. *Journal of Biophotonics* 3: 557-566.

Wang L, Weller CL (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* 17: 300-312.

Wang T, Jónsdóttir R, Ólafsdóttir G (2009) Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry* 116: 240-248.

Wang Y, Xu Z, Bach SJ *et al.* (2008) Effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on in vitro ruminal digestion of mixed forage or barley grain. *Animal Feed Science and Technology* 145: 375-395.

Wedlock DJ, Fasihuddin BA, Phillips GO (1987) Factors influencing the molecular weight of sodium alginate preparations. *Food Hydrocolbids* 1: 207-213.

Wernberg T, Russell BD, Thomsen MS, *et al.* (2011a) Seaweed communities in retreat from ocean warming. *Current Biology* 21: 1828-1832.

Wernberg T, Thomsen MS, Tuya F *et al.* (2011b) Biogenic habitat structure of seaweeds change along a latitudinal gradient in ocean temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 400: 264-271.

Wiencke C, Roleda MY, Gruber A *et al.* (2006) Susceptibility of zoospores to UV radiation determines upper depth distribution limit of Arctic kelps: evidence though field experiments. *Journal of Ecology* 94: 455-463.

Wijesinghe WAJP, Jeon Y-J (2012a) Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers* 88: 13-20.

WijesingheWAJP, JeonY-J (2012b) Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: a useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: a review. *Fitoterapia* 83:6‑12.

Wikström S, Pavia H (2004) Chemical settlement inhibition versus post-settlement mortality as an explanation for differential fouling of two congeneric seaweeds. *Oecologia* 138: 223-230.

Wong CC, Cheung PC (2001) Influence of drying treatment on three *Sargassum* species. *Journal of Applied Phycology* 13: 43-50.

Wright SW, Jeffrey SW, Mantoura RFC *et al.* (1991) Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids in marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 77: 183-196.

X

Xanthos M (1992) Reactive extrusion: principles and practice. Hanser, Munich., pp. 304.

Y

Yan X, Chuda Y, Suzuki M *et al.* (1999) Fucoxanthin as the Major Antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a Common Edible Seaweed. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63: 605-607.

Yoon KD, Chin YW, Yang MH *et al.* (2011) Separation of anti-ulcer flavonoids from *Artemisia* extracts by high-speed countercurrent chromatography. *Food Chemistry* 129: 679-683.

Yoon NY, Chung HY, Kim HR *et al.* (2008) Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities of sterols and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fischeries Science* 74: 200-207.

Yoshida T, Stiger V, Horiguchi T (2000) *Sargassum boreale sp.* nov. (Fucales, Phaeophyceae) from Hokkaido, Japan. *Phycological Research* 48: 125-131.

Yuasa I (2010) Inventor;Foley&Lardner LLP, assignee. Hepatiis-related preventive or therapeutic agents. United States patent US2010021494. 2010 Jan 28.

Z

Zea C (2011) Étude de l'évolution spatio-temporelle de populations d'algues introduites *Grateloupia Turuturu* et *Sargassum muticum* sur les côtes bretonnes. Rapport de stage Master 1. Institut Universitaire Européen de la Mer-UBO, pp. 1-20.

Zea C (2012) Phlorotannins de l'algue brune *Sargassum muticum*, espèce introduite en Bretagne: Effet du stade de développement, de l'âge des individus et variabilité temporelle. Rapport de stage Master 2. Institut Universitaire Européen de la Mer-UBO, pp. 1-37.

Zubia M, Fabre MS, Kerjean V *et al.* (2009a) Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chemistry* 116: 693-701.

Zubia M, Fabre MS, Kerjean V *et al.* (2009b) Antioxidant and cytotoxic activities of some red algae (Rhodophyta) from Brittany coasts (France). *Botanica Marina* 52: 268-277.

Zvyaginseva TN, Shevchenko NM, Chizhov AO *et al.* (2003) Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structures, and their dependence on the developmental conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 294: 1-13.

Références électroniques:

[1] www.ifremer.fr/rebent/

[2] http://oceancolor.gsfc.nasa.gov/

[3] http://en.wikipedia.org/wiki/Salinity

[4] http://www.traqueur-stellaire.net/2009/10/terraformer-la-planete-venus/

[5] www.greniercoopalbigeois.fr

[6] http://www8.umoncton.ca/umcm-gauthier_didier/siitub/gendialyse.html

ANNEXES

Annexe 1. **Utilisation de l'EPC comme étape de semi-purification**

Lors des analyses effectuées au GEPEA sur les possibilités qu'offrait la EPC en tant que procédé permettant d'améliorer l'extraction des composés phénoliques nous avons également étudié la possibilité d'utiliser cet instrument pour obtenir une fraction semi-purifiée de phlorotannins. En effet, l'emploi de plusieurs solvants étant possible en EPC, il s'agissait ici d'effectuer deux passages successifs dans l'appareil : le premier permettant la récupération, comme pour l'expérience décrite en II.3.2.1. d'une fraction apolaire riche en CP au moyen d'un mélange biphasique acétate d'éthyle/Eau, le deuxième passage faisant intervenir un mélange ternaire Eau/Ethanol/Acétate d'éthyle et devant permettre de débarrasser l'extrait apolaire des sucres (principalement le mannitol) ou autres composés polaires résiduels et pouvant précipiter dans l'éthanol. Pour cette expérience de la poudre lyophilisée de *Sargassum muticum* récoltée en Juillet 2011 au Dellec a été utilisée.

Matériels et méthodes

Deux étapes ont été nécessaires :

Etape 1 : 1 Litre d'un mélange acétate d'éthyle : eau distillée (50 :50 v/v) a été préparé : deux phases sont obtenues : une phase aqueuse saturée en AE et une phase organique saturée en eau. Tout d'abord, une suspension algale est préparée comme suit : 2 g de poudre d'algues lyophilisées sont mélangés à 150 mL de phase aqueuse; la suspension obtenue est homogénéisée à l'aide d'ultrasons pendant 15 min. La phase organique est utilisée comme phase stationnaire pendant que la suspension algale est pompée en tant que phase mobile. L'extraction est effectuée à température ambiante en utilisant un mode descendant à 800 rpm, pendant 2 min, avec un débit de 75 mL/min. En fin d'extraction, le changement de mode d'élution permet la récupération de sept fractions (Figure II.22**)**. Un aliquot de chacune des fractions est prélevé puis les fractions sont rassemblées pour constituer la phase liquide stationnaire de la deuxième étape.

Phase stationnaire durant l'extraction : phase AE saturée en eau

Phase mobile : suspension algale (phase aqueuse)

Etape 2 :

Préparation de la phase stationnaire : afin de se placer dans des conditions d'équilibre, de l'éthanol et de l'eau sont ajoutés à la phase organique obtenue précédemment et ce, dans les proportions suivantes :

Préparation de la phase mobile : en se basant sur le diagramme ternaire Eau/Ethanol/Acétate d'éthyle, 1 Litre de ce mélange a été préparé dans les proportions suivantes : 45:11:44. Ce mélange est utilisé comme phase mobile et percole à travers la phase organique maintenue stationnaire en mode descendant. L'extraction est effectuée à température ambiante en utilisant un mode descendant à 800 rpm, pendant 3 min, avec un

débit de 75 mL/min. En fin d'extraction, le changement de mode d'élution permet la récupération de cinq fractions (Figure II.22**)**. Un aliquot de chacune des fractions est prélevé.

Phase stationnaire durant l'étape de semi-purification : phase organique récupérée à l'étape 1

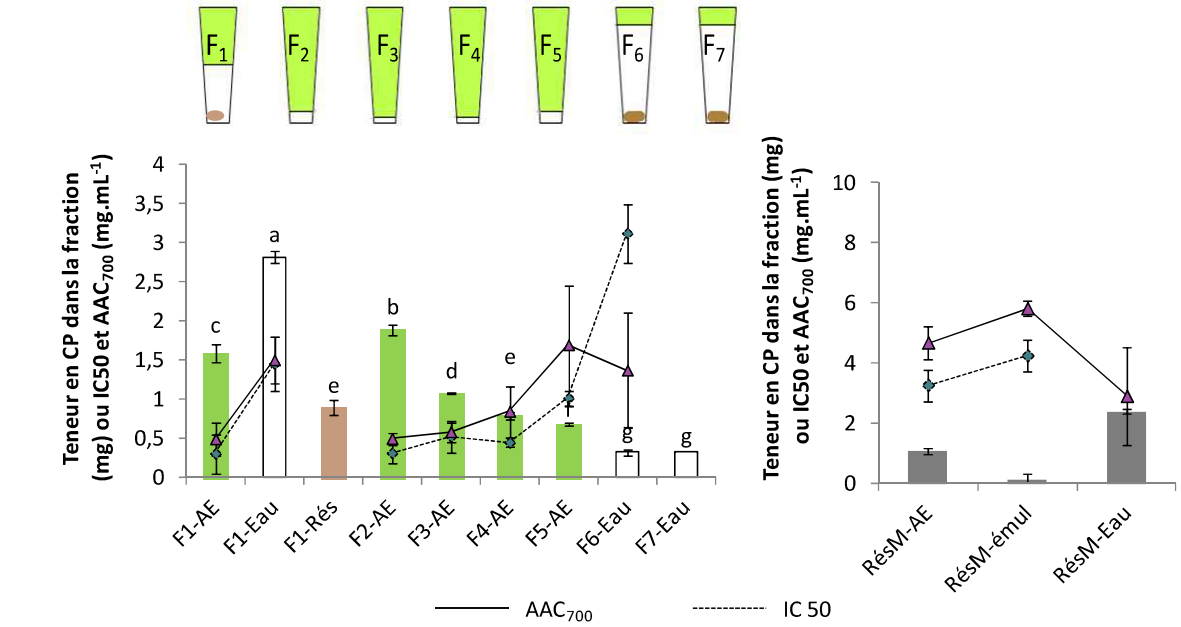
Phase mobile : mélange ternaire AE/Eau/Ethanol

Les résidus obtenus après rinçage de l'appareil à la fin de chacune des étapes sont également aliquotés. Ces résidus se présentant sous forme d'un mélange biphasique séparé par une émulsion, chacune des phases a été prélevée à part : phase supérieure (AE), phase intermédiaire (émulsion : composés amphiphiles) et phase inférieure (phase aqueuse). De la même façon, certaines fractions issues de l'élution, notamment celle provenant de la tête ou de la queue de la colonne, se présentent sous forme de fractions biphasique, dans ce cas lorsque la phase aqueuse avait un volume au moins égal à celui de la phase organique celle-ci a été prélevée à part pour les tests. Des dosages des composés phénoliques (cf. Chapitre I) ainsi que des tests d'activités anti-radicalaires et anti-oxydantes (cf. Chapitre I) sont effectués sur chacun des aliquots prélevés.

Résultats

Lors de la première étape, sept fractions sont récupérées. Si on considère les fractions organiques (AE) : on observe comme lors des expériences réalisées précédemment (II.3.3.1) que la quantité de CP diminue en fonction de l'avancement de l'expérience. Ainsi on passe de 1.58±0,12 et 1.89±0.07 mg pour les fractions F1 et F2, respectivement à 0,68±0,02 mg dans la dernière fraction F5 (Figure II.22). On remarque que les 'résidus machine' contiennent beaucoup de CP par rapport à ceux déjà extraits dans les différentes fractions : 6.03 et 3.46 mg au total dans les fractions AE et aqueuses respectivement contre 3.62 mg dans les résidus. En ce qui concerne les activités des différentes fractions, on remarque que celles-ci vont avoir tendance à diminuer légèrement au cours de l'expérience. Ainsi on passe de 0.30±0.25 à 1.01±0.09 $mg.mL^{-1}$ pour l'IC_{50} entre la fraction 1 et la 5 (Figure A.1). Cette tendance est également observée pour l'activité antioxydante. Ainsi l'AAC_{700} varie de 0.49 ±0.20 à 1.69±0.77 $mg.mL^{-1}$ entre la fraction 1 et la 5. Les phases aqueuses ($F_{1, 6, 7}$) ainsi que les résidus ont des activités anti-radicalaires ou anti-oxydantes très faibles voir nulle (>5$mg.mL^{-1}$).

Etape 1 - Premier fractionnement AE/Eau



Les fractions acétate d'éthyle ($F_{1,2,3,4,5,6,7}$) sont rassemblées à la fin de cette étape

Etape 2 - Deuxième fractionnement AE/Eau/Ethanol

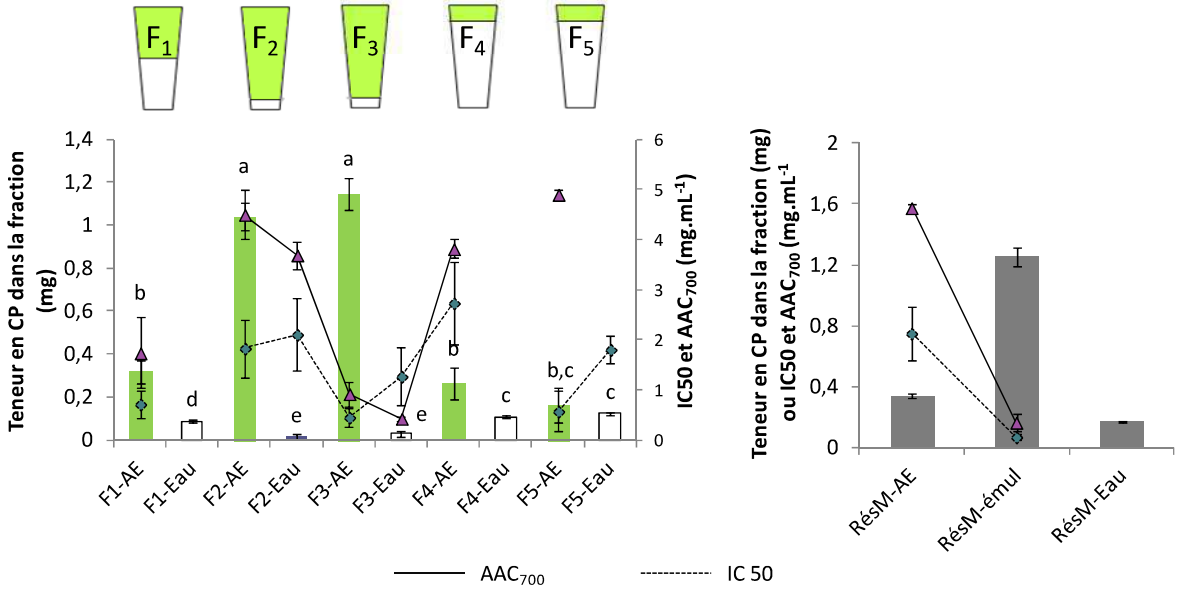


Figure A.1. Etapes d'extraction (1) et semi-purification (2) des CP par EPC. Teneurs en composés phénoliques chez *Sargassum muticum* dans les différentes fractions obtenues en sortie de colonne EPC (mg de CP ; moyenne +/- écart type). Les lettres correspondent aux résultats du test a posteriori (ANOVA, $p<0.05$; Tukey). Les courbes représentent les activités antiradicalaire et antioxydante associées ($mg.mL^{-1}$ +/- écart type).

A l'issue de la deuxième étape, cinq fractions sont récupérées. Si on considère les fractions organiques (AE) : on observe comme pour la première étape que la quantité de CP diminue en fonction de l'avancement de l'expérience. Ainsi on passe de 0.31±0,05 et 1.04±0,06 mg pour les fractions F1et F2 respectivement à 0.16±0,08 mg dans la dernière fraction (F5) (Figure A.1). On remarque que les 'résidus machine' contiennent à nouveau beaucoup de CP par rapport à ceux contenus dans les fractions : 2.92 et 0.36 mg au total dans les fractions AE et aqueuses respectivement contre 1.76 mg dans les résidus. En ce qui concerne les activités des différentes fractions, on remarque que celles-ci vont fluctuer au cours de l'expérience. Ainsi pour l'activité anti-radicalaire, on passe d'un minimum d'activité pour la fraction F4 avec un IC_{50} de 2.73±0.82 $mg.mL^{-1}$ à un maximum de 0.45±0.18 $mg.mL^{-1}$ pour la fraction F3 (Figure A.1). Des fluctuations importantes sont également observée pour l'activité antioxydante avec un minimum d'activité pour la fraction F5 4.90±0.10 et un maximum de 0.92±0.25 $mg.mL^{-1}$ pour la fraction F3 (Figure A.1). Enfin, l'activité anti-radicalaire (IC_{50}) est assez importante dans les résidus (0.75±0.18 et 0.07±0.02$mg.mL^{-1}$ pour les résidus phase AE et l'émulsion, respectivement). Les phases aqueuses, excepté la fraction 3, ainsi que les résidus machine (phase aqueuse) ont des activités anti-radicalaires ou anti-oxydantes très faibles voir nulles (>5$mg.mL^{-1}$).

Par ailleurs, on remarque que la perte de composés phénoliques en quantité totale est relativement faible entre l'étape 1 et 2 puisqu'à la fin de l'étape 1 on a extrait 6.03 mg de composés dans la phase organique (celle utilisée pour alimenter l'étape 2) et qu'on retrouve au total 5.05 mg de composés à l'issu de la phase 2 si on additionne les quantités récupérées dans les fractions AE, aqueuses et dans les résidus. En revanche si on considère uniquement la phase organique susceptible de contenir les composés d'intérêts semi-purifiés, leur quantité à été divisée par deux entre les deux étapes puisqu'on passe de 6.02 mg en fin d'étape 1 à 2.92 mg à l'issue de l'étape 2.

Discussion

Si on s'intéresse à la première étape de l'expérience, comme observé précédemment, il reste énormément de composés d'intérêt dans les résidus ce qui pourrait provenir de deux choses : d'un trop faible temps de séjour dans l'extracteur ne permettant pas à la totalité des molécules de passer en phase organique ou alors d'une grande quantité de composés phénoliques ayant plus d'affinité pour la phase mobile (ici la phase aqueuse). Il faudrait donc tester de plus longs temps de séjour pour s'assurer que la séparation est bien totale. D'autre part, dans les résidus on observe la formation d'une émulsion, ce qui pourrait expliquer en partie cette mauvaise séparation, en effet certains composés phénoliques liés à d'autres molécules pourraient donc constituer des clusters amphiphiles les empêchant de passer dans l'une ou l'autre des phases.

La deuxième partie de la manipulation devait permettre l'élimination des composés polaires restant dans l'extrait obtenu à l'issu de la première étape. En effet, l'éthanol est souvent utilisé lors de protocole de purification dans le but de précipiter les molécules polaires telles que certains sucres ou protéines (Jégou, 2011). Ce protocole permettait de tester

la faisabilité d'une telle précipitation à l'intérieur des cellules de l'extracteur. Nous avons constaté, à la concentration de matière utilisée que cela ne posait pas de problèmes de colmatage et que le débit restait constant au cours de la manipulation. Cependant, au vu des quantités de composés récupérés en fin d'élution, cette deuxième étape ne paraît pas nécessaire. On perd encore beaucoup de composés phénoliques lors de cette étape que ce soit dans les résidus ou du fait du procédé en lui-même entraînant peut-être l'oxydation de certains composés du fait des manipulations répétées. Aussi, cette étape ne semble pas utile dans le cas d'un protocole en deux étapes en revanche, il pourrait être intéressant de tester ce principe en une seule étape ce qui permettrait de raccourcir encore le temps de manipulation ainsi que la quantité de solvant utilisée.

Cependant pour des applications industrielles ce procédé n'est pas adapté : le solvant utilisé, toxique, ne permet pas de répondre aux exigences des normes européennes en matière de produits commercialisables dans l'industrie pharmaceutique ou cosmétique par exemple. Ce procédé pourrait être utilisé en amont, en recherche fondamentale, afin d'extraire rapidement les composés phénoliques de la matrice algale et ainsi permettre des analyse qualitatives et quantitatives rapides. De plus, ce type de procédé peut être couplé assez facilement à des procédés d'analyses spectroscopiques: spectrométrie de masse (CPC-MS) (Destandau *et al*., 2009 ; Toribio *et al*., 2009 ; Michel T, 2011) ou résonance magnétique nucléaire (CPC-RMN) (Spraul *et al.*, 1997) permettant d'obtenir immédiatement des informations structurales sur les molécules séparées. Cependant, ces couplages ne sont efficaces que dans le cas d'extraits issus de CPC peu complexes. Dans le cas contraire il faut ajouter une autre dimension de séparation. C'est pour cela que certains laboratoires se sont intéressés au couplage en ligne entre la CPC et l'HPLC-MS lorsque la CPC seule ne suffisait pas à séparer l'ensemble des molécules (Travaux de Michel T., 2011). Ce couplage permet, simultanément la séparation par CPC d'extraits complexes dans un premier temps et l'analyse voire l'identification des molécules séparées par HPLC-MS dans un deuxième temps. Ce couplage d'un procédé de chromatographie préparative (CPC) et analytique (HPLC) permettrait ainsi des analyses en direct rapides sur les extraits obtenus en sortie de colonne. Ce qui permet également une plus grande réactivité lorsque l'on cherche à optimiser un procédé.

Conclusion

Nous avons vu que ce procédé permettait d'extraire des composés phénoliques actifs de façon rapide. Les composés les plus actifs se retrouvent bien dans la phase acétate d'éthyle. Le solvant d'extraction choisi est donc adapté. En revanche, il reste à améliorer le protocole en prêtant attention aux paramètres de l'expérience et surtout au temps de séjour. Les résidus étant encore trop riches en composés d'intérêt.

Annexe 2. **Hydrolyse enzymatique**

Les résultats de l'étude de l'effet de l'hydrolyse enzymatique sur l'extraction de composés d'intérêts chez l'algue brune *Sargassum muticum* sont présentés dans un manuscrit soumis à la revue «Journal of Applied Phycology», sous la référence suivante :

"Bioactive antiviral enzymatic hydrolysates from different invasive French seaweeds"

Hardouin Kévin, Burlot Anne-Sophie, Umami Arif, Tanniou Anaëlle, Stiger-Pouvreau Valérie, Widowati Ita, Bedoux Gilles, Bourgougnon Nathalie

JAP 2013- DOI 10.1007/s10811-013-0201-6

Le but de cette étude était de proposer l'utilisation d'enzymes comme moyen d'améliorer le rendement d'extraction de composés antiviraux à partir d'algues invasives françaises. Trois espèces ont donc été sélectionnées dans ce but : l'algue rouge *Solieria chordalis*, l'algue verte *Ulva sp.* et l'algue brune *Sargassum muticum*. Ce procédé a été comparé à une extraction à l'eau à 50°C afin de mesurer l'efficacité de l'hydrolyse par rapport à l'extraction solide/liquide classique. Les données mettent en avant le potentiel de l'hydrolyse enzymatique pour la production de fractions actives à partir de biomasse algale, le comportement des parois ainsi que la sélectivité et l'action de l'enzyme. L'hydrolyse enzymatique apparaît moins efficace pour l'extraction des composés phénoliques mais semble très prometteuse en tant que technique d'extraction douce pour les protéines, les sucres neutres, l'acide uronique ainsi que les groupes sulfatés. Ce procédé sans solvant permet de hauts rendements d'extraction, est rapide et peu coûteux ce qui en fait une méthode économique et durable. Les tests de viabilité cellulaire ont montré que les extraits étaient tous non toxiques pour les cellules de type Vero. Après 3 jours de traitement, aucune altération de la morphologie des cellules n'est visible au microscope même à 500 $\mu g.mL^{-1}$. Les extraits de *Solieria chordalis* ont montré des activités anti-virales intéressantes avec des EC50 compris entre 23.0 et 101.1 $\mu g.mL^{-1}$ pour une multiplicité d'infection de 0.001 ID50/cellules ; 100% et 98% de la protection cellulaire sont obtenus pour 500 $\mu g.mL^{-1}$d'hydrolysat à partir de la carbohydrase C3 et du blanc, respectivement. Les autres extraits de *S. chordalis* inhibent la production virale moins efficacement.

Cette étude fait partie du travail de thèse de Mr Hardouin, l'analyse a été faite sur plusieurs espèces algales. Aussi, pour faciliter la lecture des résultats concernant la macroalgue brune étudiée : *Sargassum muticum,* les résultats correspondant ont été colorés en rouge dans le manuscrit présenté ci-après.

J Appl Phycol
DOI 10.1007/s10811-013-0201-6

Biochemical and antiviral activities of enzymatic hydrolysates from different invasive French seaweeds

K. Hardouin · A-S. Burlot · A. Umami · A. Tanniou · V. Stiger-Pouvreau · I. Widowati · G. Bedoux · N. Bourgougnon

Received: 26 May 2013 /Revised and accepted: 29 October 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Proliferations of green, brown and red algae appear in shallow sandy bays in North Brittany (France), and they represent a real economic constraint for the affected communities. In addition to the nuisance for residents and tourist activity, the communities must carry out systematic collection. The collected algae are spread on agricultural land spreading or composted, but these solutions reach their limits rapidly, bringing little added value to the collected algae. Seaweeds are potentially excellent sources of bioactive metabolites that could represent useful leads in the development of new functional ingredients in pharmaceutical and cosmetic industries. The aim of this study was to propose the use of an enzyme-assisted extraction as a tool to improve the extraction efficiency of antiviral compounds from three invasive French seaweeds. We selected the red *Solieria chordalis*, the green *Ulva* sp. and the brown *Sargassum muticum* as models for these experiments. In comparison with water extraction at 50 °C for the same time of treatment, enzymatic hydrolysis increased the yields. The data suggest the potential of enzymatic hydrolysis for producing active fractions in the function of the algal biomass, the behaviour of the cell wall, the selectivity and the action of the enzyme. Enzymatic hydrolysis appeared less effective for polyphenol recovery, but was a promising softer technique for recovering proteins, neutral sugars, uronic acids and sulphate groups. The solvent-free process, higher extraction rate and higher yields, coupled to time-saving and lower cost, make this method economical and sustainable. By using a cell viability assay, all hydrolysate fractions tested were shown to be non-toxic to Vero cells. After 3 days of treatment, no microscopically visible alteration of normal cell morphology was observed even at 500 μg mL^{-1}. *S. chordalis* extracts have an effective antiviral activity with EC_{50} between 23.0 and 101.1 μg mL^{-1} at a multiplicity of infection of 0.001 ID_{50}/cells; 100 % and 98 % cellular protection were obtained for 500 μg mL^{-1} of hydrolysate extracts carbohydrase C3 and blank, respectively. Other extracts from *S. chordalis* inhibited viral production less effectively.

Keywords *Sargassum muticum* · *Solieria chordalis* *Ulva* sp · Hydrolysates · Protease · Carbohydrase · Antiherpetic activity

Introduction

Marine algae from the French Brittany coasts (North West of France) constitute a significant and diverse natural vegetable production. The diversity of macroalgal species occurring in Brittany is due to abiotic factors (substrate, seawater temperature, hydrodynamism, light conditions), which are optimal for the development of macroalgae. As a result, nearly 700 species of algae are currently listed for the Breton littoral (Arzel 2000; Dizerbo and Herpé 2007; Bourgougnon and Stiger-Pouvreau 2011). The use of algae has existed for centuries in Brittany. Since the 1920s, marine macroalgae have been harvested by many companies along the Brittany coast (Arzel 1987, 2000; Arzel and Barbaroux 2003) initially to extract sodium carbonate, iodine and then later the colloids—

K. Hardouin · A.-S. Burlot · A. Umami · G. Bedoux · N. Bourgougnon (✉)
Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA3884, UBS, IUEM, 56000 Vannes, France
e-mail: nathalie.bourgougnon@univ-ubs.fr

A. Umami · I. Widowati
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Kampus Tembalang, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

A. Tanniou · V. Stiger-Pouvreau
LEMAR (UMR 6539 CNRS UBO Ifremer IRD), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), Université de Bretagne Occidentale (UBO), Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

Published online: 20 November 2013

Fucales, Sargassaceae) was harvested in June 2012 on Grand Dellec, Plouzané (48°22′56″N, 4°37′0″W). To remove adherent seawater, sediment, organic debris, macrofauna and epibiota, they were scraped and rinsed with distilled water. The seaweeds were ground to pieces of about 3 mm with a hammer mill. The ground biomass was stored at −25 °C prior to extraction.

Preparation of enzymatic hydrolysates from seaweeds

Six commercial enzymes were used for the hydrolysis of seaweeds: two types of proteases (endo-peptidase, endo-protease) which will be named P1 and P2 and four types of carbohydrases (cellulase, xylanase, β-glucanase, arabanase) which will be named C1, C2, C3 and C4.

Hydrolysis experiments with Ulva Extractions were performed in a bioreactor on 500 g of crushed algae (8.3 % dry matter) added to 500 mL of distilled water. Algae were submitted to each enzyme (0.5 %, *w/w*) for a short period of 5 h at 50 °C.

Hydrolysis experiments with S. chordalis Extractions were performed in a bioreactor on 100 g of crushed algae (19.9 % dm) added to 200 mL of distilled water. Algae were submitted to each enzyme (0.5 %, *w/w*) for a short period of 5 h at 50 °C.

Hydrolysis experiments with S. muticum Two g of dried algal sample was homogenized in 48 mL phosphate buffer and incubated in a batch thermostatic reactor. The enzymatic hydrolysis was performed under conditions (5 % MS, 50 °C, 5 h).

Enzymes were then denatured at 90 °C for 15 min. After hydrolysis, the hydrolysates were centrifuged at 8,000×*g* for 15 min at 20 °C to separate undigested residues and solubilized compounds. After centrifugation, the supernatants were filtered and then recovered. The supernatants were lyophilized, weighed and stored at −20 °C until analysed. A blank, water extract (algal powder extracted with distilled water/phosphate buffer for 5 h at 50 °C) served as control. These results correspond to the composition of hydrolysate fractions defined as the dry weight percentage of each chemical compound in hydrolysate obtained with respect to the initial algal sample (Fig. 1).

Composition analysis of hydrolysis extracts

Specimens of the hydrolysed extract samples were used for composition analysis. *Ash* values were determined gravimetrically after incineration of samples at 550 °C for 16 h, followed by 2 h at 900 °C. *Neutral sugars* were determined by the phenol sulphuric acid colorimetric method of Dubois et al.

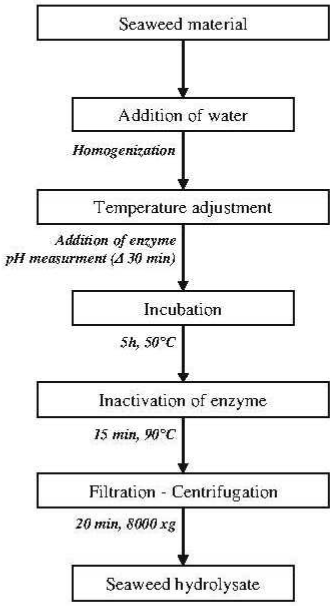


Fig. 1 Preparation of enzyme hydrolysates from seaweeds

(1956). This method is based on the reduction of neutral sugars, and a little part of uronic acids, in 5-hydroxymethylfurfural by phenol, giving a yellow colour. Anhydrous D-glucose was used as standard (0–100 μg mL^{-1}). Fifty μL of phenol 75 % (*v/v*) in water was added to 1 mL of standard or diluted sample and stirred; 2.5 mL of sulphuric acid was added directly into the sample, stirred, cooled in fresh water and incubated for 10 min at room temperature and 10 min at 30 °C. Titrations were done in triplicate. The OD was measured at 490 nm.

Uronic acids were determined using the meta-hydroxy-diphenyl (MHDP) method (Blumenkrantz and Asboe-Hansen 1973). Under the action of hot concentrated mineral acids, uronic acids undergo internal dehydration followed by cyclization leading to the formation of derivatives 5-formylfuroic acids. These derivatives react with the MHDP (0.15 % in sodium hydroxide 0.5 %, *w/v*) to form a pink chromophore absorbing at 525 nm. The colour was enhanced by the presence of tetraborate sodium salt (75 mM in sulphuric acid 96 %, *w/v*), but remains highly sensitive to interferences of neutral sugars. The addition of sulfamic acid potassium (4 M) salt limited these interferences; 400 μL of sample or standard was added to 40 μL of sulfamic acid and stirred; 2.4 mL of tetraborate was added to the mixture, stirred and incubated for 20 min at 80 °C and then cooled in fresh water for 5 min. After the addition of 80 μL of MHDP, the mixture was incubated for 10 min at room temperature and the OD measured at 525 nm. Samples were done in triplicate.

The *sulphated groups* content of polysaccharides was determined by the Azure A (Sigma-Aldrich A6270) method (Jaques et al. 1968) which reacts specifically with sulphates linked in polysaccharides. This reaction is based on the formation of a complex between sulphate groups and the 3-amino-7-(dimethylamino) phenothizin-5-ium (Azure A) to give a purple colour. A sulphated dextran (17 %) was used as standard (0–100 μg mL^{-1}). Two hundred μL of standard or samples added to 2 mL of Azure A reagent (10 mg L^{-1}) were used for the reaction. The OD was measured at 535 nm.

The *protein content* was determined by the bicinchinonic acid colorimetric method (BCA) (Smith et al. 1985) with a Micro BC Assay Kit (cat. UP75860C, Interchim). Bovine serum albumin was used as standard (0–100 μg mL^{-1}). Titrations were done in triplicate. The OD was measured at 540 nm. The *total nitrogen* content (% N) was determined using the Kjeldahl method (Crooke and Simpson 1971).

The *lipid* content was determined by a two-time extraction of 500 mg of dried algae with 10 mL of acetone at 60 °C. Samples were pooled and dried under air flow. Lipids were then extracted twice from the residue with 10 mL of hexane. Samples were then pooled, dried and weighted. The measurement was done in duplicate.

The *total phenolic content* (TPC) of enzymatic extracts from hydrolysate was quantified spectrophotometrically ac cording to the method of Turkmen et al. (2005) with minor modifications. One milliliter of aliquot of extract solution (concentration ranges from 1 to 5 mg mL^{-1}) was mixed with 5 mL Folin Ciocalteu reagent (10 % in distilled water). After 5 min, 4 mL of sodium carbonate (7.5 % in distilled water) was added. The samples were incubated for 2 h at room temperature in the dark. The absorbance was measured at 760 nm. A standard curve with serial gallic acid solutions was used for calibration. Results were expressed as g gallic acid equivalents (GAE) per kg of extract (Wang et al. 2010).

Determination of antiviral activity of hydrolysate fractions

Cells and viruses African green monkey kidney cells (Vero, ATCC CCL-81) were grown in Eagle's minimum essential medium (MEM, Eurobio) supplemented with 8 % fetal calf serum (FCS, Eurobio) and 1 % of antibiotics PCS (10, 000 IU mL^{-1} penicillin, 25,000 IU mL^{-1} colimycin, 10 mg mL^{-1} streptomycin; Sigma-Aldrich). HSV-1 (wild-type strain 17, sensitive to acyclovir) was obtained from Pr. Agut, Laboratoire de Dynamique, épidémiologie et traitement des infections virales de la Pitié Salpétrière (Paris, France).

Cytotoxicity assays based upon cell viability Using the Vero cell/HSV-1 model, cytotoxicity was evaluated by incubating cellular suspensions (3.5×10^5 cells mL^{-1}) with various dilutions (concentration from 1 to 500 μg mL^{-1}, four wells per concentration) of fractions in 96-well plates (72 h, 37 °C, 5 % CO_2) in Eagle's MEM containing 8 % FCS. The cells were examined daily under a phase-contrast microscope to determine the minimum concentration of hydrolysate dry matter that induced alterations in cell morphology, including swelling, shrinkage, granularity and detachment. Cytotoxicity by cell viability was tested using the neutral red dye method. Optical density (OD) was measured at 540 nm. The 50 % cytotoxic concentration (CC_{50}) was defined as the concentration that reduced the OD of treated cells to 50 % of that of untreated cells.

CC_{50} values were expressed as the percentage of destruction (%*D*): $[(OD_c)_C-(OD_c)_{MOCK}\ /\ (OD_c)_C]\times100$, where $(OD_c)_C$ and $(OD_c)_{MOCK}$ are the OD values of the untreated cells and treated cells, respectively (Langlois et al. 1986).

Antiviral assays based upon cell viability Using the Vero cell/HSV-1 model, 100 μL of cell suspension (3.5×10^5 cells mL^{-1}) in Eagle's MEM containing 8 % FCS was incubated with 50 μL of a dilution of fractions (concentration from 10 to 500 μg mL^{-1}) in 96-well plates (72 h, 37 °C, 5 % CO_2). Three replicates were infected using 50 μL of medium and a virus suspension at a multiplicity of infection (MOI) of 0.001 ID_{50}/cells. After incubation, antiviral activity was evaluated by the neutral red dye method. The antiherpetic compound acyclovir [9 (2 hydroxyethoxymethyl) guanine] was used as reference inhibitor. The 50 % effective antiviral concentration (EC_{50}) was expressed as the concentration that achieved 50 % protection of virus-infected cells from virus-induced destruction. The OD was related directly to the percentage of viable cells, which was inversely related to the cytopathic effect (CPE). The linear regression was determined for each assay on the basis of cell controls (0 % CPE) and virus controls (100 % CPE). Data were expressed as a percentage of protection (%*P*): $[((OD_t)_{virus}-(OD_c)_{virus})\ /\ ((OD_c)_{MOCK}-(OD_c)_{virus})]\times100$, where $(OD_t)_{virus}$ is the OD of the test sample, $(OD_c)_{virus}$ is the OD of the virus control and $(OD_c)_{MOCK}$ is the OD of the mock-infected control (McLaren et al. 1983; Langlois et al. 1986).

Statistical analysis

Results are expressed as means ± standard deviation (SD) ($n=3$). The statistical analysis was carried out on SPSS v20 (IBM, USA) using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan test at 5 % level ($p<0.05$) to evaluate differences between samples. For each series of values, the significant differences are labelled by superscript letters.

Results

Proximate composition analyses showed that the dried *Ulva* sp. sample contained 15.9±1.2 % ash, 23.2±1.4 % neutral

sugars, 21.1±0.9 % uronic acids, 20.1±0.9 % sulphated groups, 24.4±0.1 % proteins and 0.6 % total phenol. The dried *S. chordalis* powder contained 27.4±1.0 % ash, 9.8±1.1 % neutral sugars, 8.0±0.2 % uronic acids, 5.6±0.1 % sulphated groups, 29.3±4.3 % proteins and 2.1 % total phenol. The dried *S. muticum* sample contained 25.5±1.1 % ash, 39.7±1.3 % neutral sugars, 1.8±0.1 % uronic acids, 8.8±0.6 % sulphated groups, 22.1±0.6 % proteins and 0.9 % total phenol (Table 1). Enzymatic hydrolysis was performed using the two proteases and four carbohydrases on the three seaweeds. Two fractions were generated: an insoluble sludge and soluble aqueous phase. Only the soluble aqueous phase was studied. Yields, total proteins, polyphenols, neutral sugars, uronic acids and the sulphated groups content from the hydrolysates were quantified and compared. For each analysis, the results were presented by the percentage of dry matter yield in hydrolysate. We obtained two data: (1) the best enzyme for improving the extract yield and (2) the capacity of selective enzyme for isolating a type of compound.

Dry matter yields

The dry matter yields are shown in Fig. 2a–c. Important differences can be observed between the algal raw material and the choice of enzymes. For the water extract (blank), 35.0 %, 28.8 % and 11.6 % of dry matter yields were obtained in the soluble phase, respectively, from *Sargassum*, *Ulva* and *Solieria* biomass. After 5 h of hydrolysis, the major percentage of dry matter yield was contained in the supernatant of the two proteases for *Ulva* sp.—51.0 % and 52.5 % for P1 and P2, respectively. For *Ulva* biomass (Fig. 2a), proteolysis clearly improved solubilization of dry matter. Similar results but slightly lower were found on *Sargassum* biomass showing 48.2 % and 46.9 % dry matter yields, respectively, for P1 and P2 (Fig. 2b). C3 carbohydrase also gave good results with the highest yield of 48.4 % of dry matter. The results are very different with *Solieria* biomass (Fig. 2c). Indeed, the dry matter yield never exceeded 22.1 % (C2 carbohydrase). In comparison with water extraction at 50 °C for the same time of treatment, enzymatic hydrolysis increased the level of yields.

Proteins

Protein recoveries from the soluble fraction after hydrolysis by the six enzymes are given in Fig. 3. The percentages of dry matter yield in hydrolysates correspond to the composition of hydrolysate fractions defined as the dry weight percentage of each chemical compound in hydrolysate obtained with respect to the initial algal sample. For *Ulva* sp. (Fig. 3a), they ranged between 6.27±0.35 % for C2 carbohydrase and 9.92±0.30 % for P1 protease. For *Sargassum* (Fig. 3b), they ranged between 38.40±1.3 % for C2 carbohydrase and 53.80±2.1 % for C1 carbohydrase. The percentages of dry matter in hydrolysate are lower than the percentage of the blank (58.10±1.7 %). For *Solieria* (Fig. 3c), they ranged between 11.60±0.20 % for P2 protease and 15.20±0.30 % for P1 protease. Except P2 protease (11.60±0.20 %) and C4 carbohydrase (12.20±0.30 %), the percentages of dry matter in hydrolysate are higher than in the blank (12.70±0.50 %), but they do not exceed 15.20±0.30 % with P1 protease. Carbohydrases present the same recovery levels (13.5 % dry matter in hydrolysate). P1 protease appears as the most effective enzyme for protein recovery and accessibility. Regardless of the raw material or the enzyme used, hydrolysis increased the level of protein in the hydrolysates only for the *Solieria* biomass. For *Sargassum*, in spite of yields lower than those obtained by aqueous extraction, the results show good levels of extraction with the enzyme.

Total polyphenols

Analysis of the percentage of dry matter yield shows that, compared to the blank extract, the enzymatic hydrolysis entails extraction of polyphenol from the green biomass. The polyphenolic content in hydrolysate samples is higher than in the water extract, particularly for protease hydrolysis. The action of the enzymes is less marked on *Solieria* and *Sargassum* biomass.

Considerable variation was observed in total polyphenolic content among different enzymatic hydrolysates and biomass ranging from 0.41±0.02 % (C3) to 0.99±0.17 % (P2) dry matter of total polyphenolic content in hydrolysates for *Ulva* sp. (Fig. 4a), from 4.40±0.18 % (C3) to 5.40±0.13 % (C2) dry matter of total polyphenolic content in hydrolysates for *S. muticum* (Fig. 4b) and from 0.60±0.10 % (C3) to 1.00±0.30 % (P1) dry matter of total polyphenolic content in hydrolysates for *S. chordalis* (Fig. 4c). All the proteases and C1/C4 carbohydrase-treated groups had significantly higher percentage values than the water extract of *Ulva* biomass. The total polyphenolic contents of the hydrolysates for *Solieria* and *Sargassum* biomass extracted by proteases

Table 1 Chemical composition of the three seaweeds. Values are means ± SD ($n=3$). Values with different letters are significantly different ($p<0.05$)

(% dry algae)	Ash	Neutral sugars	Uronic acids	Sulphate groups	Proteins	Total nitrogen	Lipids	Total phenol
Ulva sp.	15.9±1.2 a	23.2±1.4 b	21.1±0.0 c	20.1±0.9 a	24.4±0.1 a	4.0±0.1 c	0.6±0.0 a	0.6±0.0 a
Sargassum muticum	27.4±1.0 c	9.8±1.1 a	8.0±0.2 b	5.6±0.1 a	29.3±4.3 b	3.2±0.1 b	1.0±0.1 b	2.1±0.0 b
Solieria chordalis	25.5±1.1 b	39.7±1.2 c	1.8±0.1 a	8.8±0.6 b	22.1±0.6 a	3.1±0.0 a	0.9±0.1 b	0.9±0.0 a

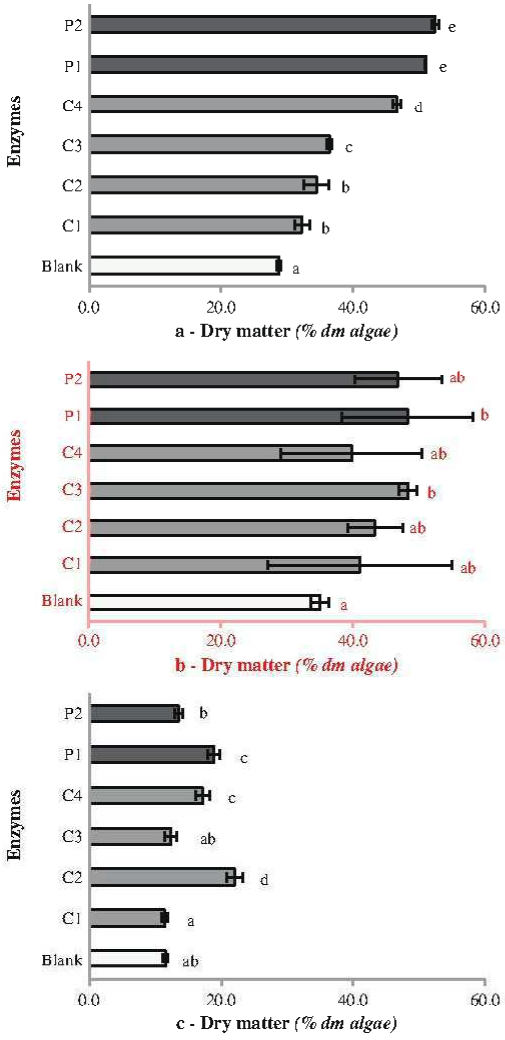


Fig. 2 Dry matter yield hydrolysates of *Ulva* (**a**), *Sargassum* (**b**) and *Solieria* (**c**). Values are means ± SD ($n=3$). *Values with different superscript letters* are significantly different ($p<0.05$). Protease hydrolysates are indicated with *dark grey bars*; carbohydrase hydrolysates by *light grey bars*; water extracts by *white bars*

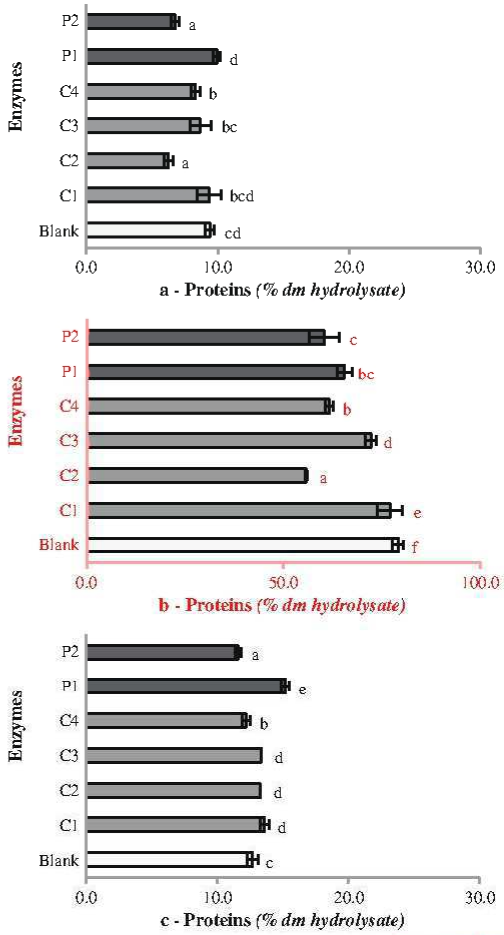


Fig. 3 Content of proteins in hydrolysates of *Ulva* (**a**), *Sargassum* (**b**) and *Solieria* (**c**). Values are means ± SD ($n=3$). *Values with different superscript letters* are significantly different ($p<0.05$). Protease hydrolysates are indicated with *dark grey bars*; carbohydrase hydrolysates by *light grey bars*; water extracts by *white bars*

and carbohydrases were generally lower except P1 protease for *Solieria*. In the case of *Sargassum*, all hydrolysates had lower total polyphenolic content values than the water extract.

Neutral sugars content

Except one example with action of C2 carbohydrase on *Sargassum* biomass, enzymatic hydrolysis appears to be a good method to improve extraction efficiency of soluble neutral sugars (Fig. 5). For each biomass, the percentage of dry matter yield in hydrolysate for neutral sugar is superior to the percentage of dry matter yield of the water extract. Like the protein or polyphenol content, the access to soluble molecules is not the same according to the choice of enzyme and the type of biomass. All the carbohydrase-treated groups had significantly higher percentage values than the water extract (8.99± 1.79 %) with values for *Ulva* biomass ranging from 15.35± 3.25 % (C2) to 21.09±3.98 % (C3) dry matter of total sugars in hydrolysate (Fig. 5a). For *Sargassum*, except C2 (7.76± 1.81 %), all the enzymes had significantly higher percentage

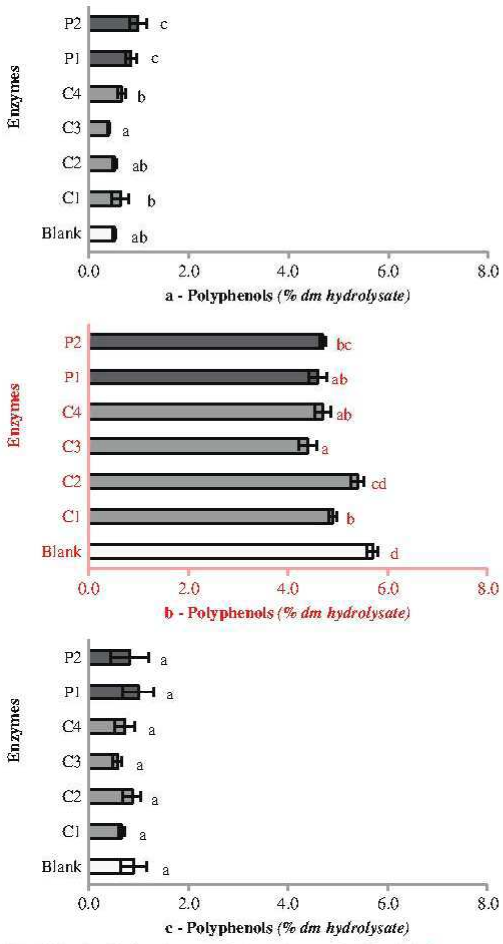


Fig. 4 Total polyphenol content in hydrolysates in *Ulva* (**a**), *Sargassum* (**b**) and *Solieria* (**c**). Values are means ± SD (n=3). *Values with different superscript letters* are significantly different (p <0.05). Protease hydrolysates are indicated with *dark grey bars*; carbohydrase hydrolysates by *light grey bars*; water extracts by *white bars*

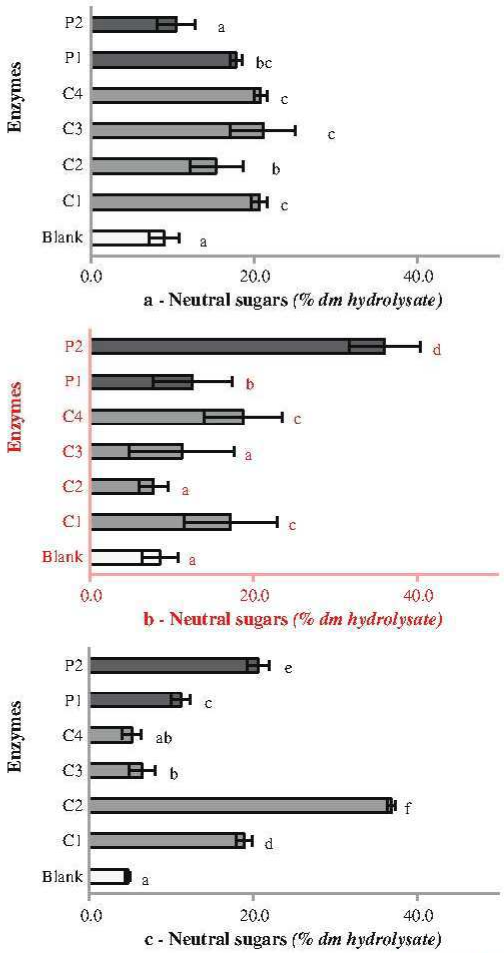


Fig. 5 Neutral sugars content in hydrolysate of *Ulva* (**a**), *Sargassum* (**b**) and *Solieria* (**c**). Values are means ± SD (n=3). *Values with different superscript letters* are significantly different (p <0.05). Protease hydrolysates are indicated with *dark grey bars*; carbohydrase hydrolysates by *light grey bars*; water extracts by *white bars*

values than the water extract (8.57±2.21 %) ranging from 11.22±6.41 % (C3) to 36.07±4.37 % (P2) dry matter of total sugar in hydrolysates (Fig. 5b). For *Solieria*, all the enzymes had significantly higher percentage values than the water extract (4.7±0.3 %) ranging from 36.8±0.5 % (C2) to 5.2±1.2 % (C4) dry matter of total sugar in hydrolysates (Fig. 5c).

Uronic acids content

Considerable variation was observed in uronic acids content among the different enzymatic hydrolysates (Fig. 6) ranging from 8.91±2.19 % (C2) to 18.57±1.15 % (C3) dry matter of total uronic acid in hydrolysates of *Ulva* sp. (Fig. 6a) compared with the water extract (21.45±4.19 %); in *S. muticum*, it ranged from 14.15±0.28 % (P1) to 28.41±1.87 % (C3) dry matter of total uronic acids in hydrolysates (Fig. 6b) compared with the water extract (21.43±1.14 %); and finally in *S. chordalis*, it ranged from 11.5±4.2 % (C1) to 22.1±4.2 % (C2) dry matter of total uronic acids in hydrolysates (Fig. 6c). For uronic acids, water hydrolysis appears to be more efficient than enzymatic hydrolysis for green biomass.

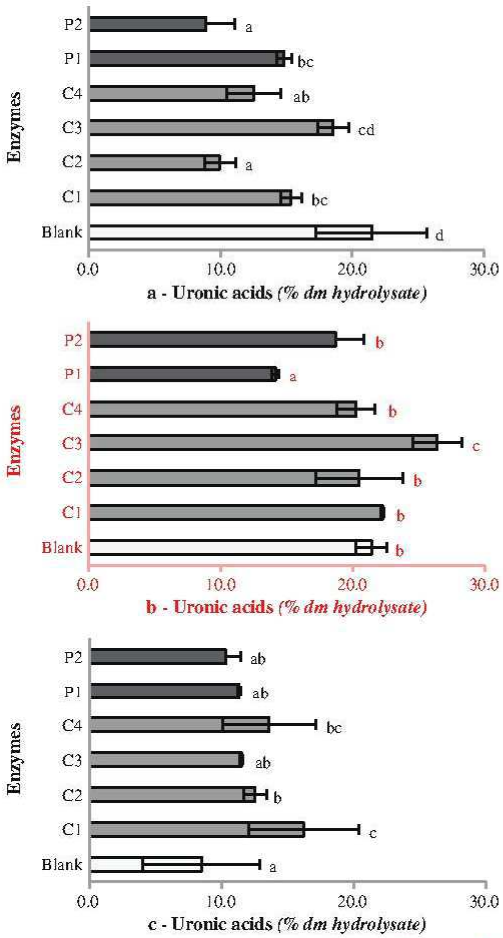


Fig. 6 Uronic acids content in hydrolysate of *Ulva* (**a**), *Sargassum* (**b**) and *Solieria* (**c**). Values are means ± SD (n=3). *Values with different superscript letters* are significantly different (p <0.05). Protease hydrolysates are indicated with *dark grey bars*; carbohydrase hydrolysates by *light grey bars*; water extracts by *white bars*

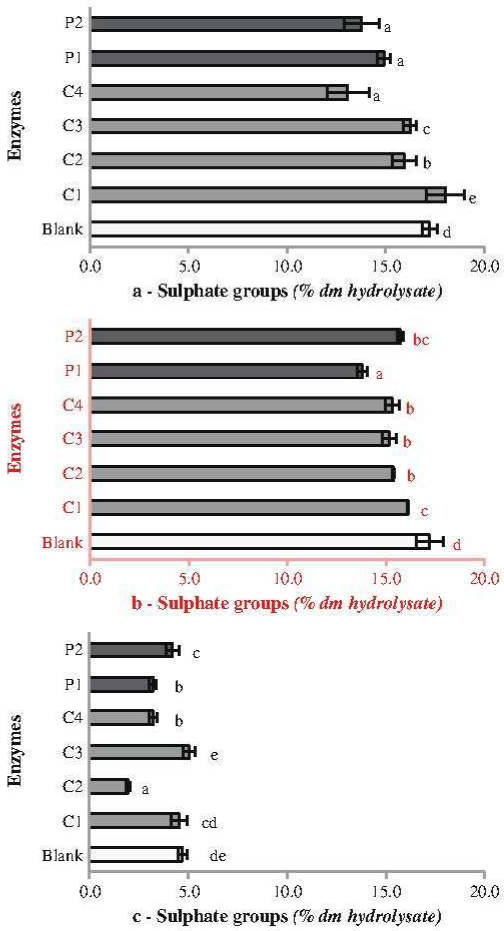


Fig. 7 Sulphate groups in hydrolysate of *Ulva* (**a**), *Sargassum* (**b**) and *Solieria* (**c**). Values are means ± SD (n=3). *Values with different superscript letters* are significantly different (p <0.05). Protease hydrolysates are indicated with *dark grey bars*; carbohydrase hydrolysates by *light grey bars*; water extracts by *white bars*

Sulphated groups

Differences in the presence of sulphated groups were observed between green–brown raw materials and red raw material (Fig. 7). Indeed, for green and brown algae raw materials, the percentage of dry matter yield in hydrolysates is slightly less than the hot aqueous extract (17.24±0.38 %) for the sulphate group content except carbohydrase C1-treated (18.04±0.95 %) *Ulva* biomass (Fig. 7a, b). For *Solieria*, the behaviour of the enzymes is very different (Fig. 7c). Except for the C3 carbohydrase-treated material (5.0±0.3 %), the percentage of dry matter yield in hydrolysates is slightly less than the hot aqueous extract (4.7±0.2 %). In comparison with previous results, the percentages do not exceed 5 % dry matter of sulphated groups in hydrolysates.

All the commercial enzymes tested in this study were effective in improving the extraction yield, but to a different extent compared with water extraction. Table 2 summarises the best results in the hydrolysates in comparison with the water-soluble extracts. Except for *Sargassum* material, proteases are more adapted for the extraction of proteins. In the case of *Sargassum*, the C1 carbohydrase (multicomplex enzyme) exhibited the highest extraction efficiency of protein content compared to other proteases and carbohydrases tested. For

Table 2 Summary of best results: action of enzyme on raw algal material (P1/P2 protease, C1/C2/C3 carbohydrase)

Content % dry matter of compounds in hydrolysate	*Ulva* sp.	*Sargassum muticum*	*Solieria chordalis*
Soluble protein	P1—9.9±0.3 %	C1—53.8±2.1 %	P1—15.2±0.3 %
Total polyphenol content	P2—1.0±0.2 %	C2—5.4±0.1 %	P2—1.0±0.3 %
Neutral sugars content	C3—21.1±3.9 %	P2—36.1±4.4 %	C2—36.8±0.5 %
Uronic acids content	C3—18.6±1.1 %	C3—26.4±1.9 %	C2—22.1±0.9 %
Sulphate groups	C1—18.04±0.9 %	C1—16.1±0.1 %	C3—5.0±0.3 %

extraction of polyphenolic compounds, enzymatic hydrolysis seems less effective. The percentages of dry matter of polyphenolic compounds do not exceed 5.4 % (for *Sargassum* material). However, for neutral sugars extraction, enzymatic hydrolysis was effective in enhancing the recovery of neutral sugars. Proteases for *Sargassum* or carbohydrases for *Ulva* and *Solieria* exhibited the greatest percentage of dry matter in hydrolysates. For the uronic acids and sulphated groups contents, carbohydrases exhibited the greatest percentage of dry matter in hydrolysates.

In vitro antiviral activity of hydrolysate fractions

After 3 days of treatment, microscopically visible alteration of normal cell morphology was observed and viability assay showed destruction of the cell layer. No cytotoxic effect of the compounds on the Vero cells was observed in the range of the concentrations assayed for all compounds. No cytotoxicity effect was detected for the hydrolysate fractions from the three seaweeds (Table 3).

For hydrolysate fractions extracted from *Ulva* sp. and *S. muticum*, no anti-HSV-1 activity was observed for a MOI of 0.01 ID_{50}/cells. *S. chordalis* extracts had an effective antiviral activity with EC_{50} between 23.0 and 101.1 μg mL^{-1} at a MOI of 0.001 ID_{50}/cells; 100 % and 98 % cellular protection were obtained for 500 μg mL^{-1} of hydrolysate extracts carbohydrase C3 and blank, respectively. Other extracts from *S. chordalis* were less effective in inhibiting viral production.

Discussion

Composition of seaweeds The percentage concentrations of protein, neutral sugars, uronic acids and sulphate contents in the dried seaweed samples were in agreement with previous French studies. French species of *Ulva lactuca* (sea lettuce) show a lower protein level (10–25 % of dry weight). Analysis of Centre d'Etude et de Valorisation des algues (CEVA http://www.ceva.fr/) showed that French "*Ulva lactuca*" specimens had the following content of proteins (10–24 % of dry weight), carbohydrates (38–60 % of dry weight in which 45 % of polysaccharides can be detected) and minerals (14–29 %). *Ulva pertusa* and *Ulva intestinalis*, from Southern Thailand, contained high levels of protein (14.6–19.5 % dry weight (dw)). Biomass of *Ulva* has very low added value and ways to use it besides compost and methane production could be by taking advantage of specific properties of their cell wall polysaccharides. The latter are essentially represented by ulvan, which is a complex sulphated polysaccharide drawing increasing interest as a potential source of new functional biopolymer

Table 3 Evaluation of anti-HSV activity on Vero cell line of hydrolysate fractions extracted from the three seaweeds, by neutral red dye method

	Ulva sp. hydrolysate		*Sargassum muticum* hydrolysate		*Solieria chordalis* hydrolysate	
	CC_{50} (μg mL^{-1})	EC_{50} (μg mL^{-1})	CC_{50} (μg mL^{-1})	EC_{50} (μg mL^{-1})	CC_{50} (μg mL^{-1})	EC_{50} (μg mL^{-1})
Drug (acyclovir)	>500.0	0.3±0.1	>500.0	0.3±0.1	>500.0	0.3±0.1
Blank	>500.0	>500.0	>500.0	>500.0	>500.0	23.0±1.7
C1	>500.0	>500.0	>500.0	>500.0	>500.0	72.0±22.5
C2	>500.0	>500.0	>500.0	>500.0	>500.0	44.3±3.4
C3	>500.0	>500.0	>500.0	>500.0	>500.0	29.3±2.8
C4	>500.0	>500.0	>500.0	>500.0	>500.0	34.0±14.9
P1	>500.0	>500.0	>500.0	>500.0	>500.0	101.1±11.0
P2	>500.0	>500.0	>500.0	>500.0	>500.0	58.8±14.4

MOI: multiplicity of infection: ratio (virus titer)/(cells number mL^{-1}). CC_{50}: the 50 % cytotoxic concentration. The concentration that reduced the absorbance of mock-infected cells to 50 % of that of controls. EC_{50}: the 50 % antiviral effective concentration: concentration that achieved 50 % protection of virus-infected cells from the HSV-induced destruction

(Ray and Lahaye 1995; Lahaye and Robic 2007). Ulvan represents about 8–29 % of the algae dry weight (Robic et al. 2008). Significant seasonal fluctuations of protein, neutral sugars or uronic acids content in seaweeds have been previously reported in relation with species and geographic areas. The chemical composition and some functional properties of the dried "*Ulva lactuca*", collected from Tunisia, were determined by Yaich et al. (2011). They showed that "*U. lactuca*" alga powder was characterized by a high content of fibers (54.0 % —soluble fibers 20.5 %), soluble sugars (0.64 %), uronic acid (9.9 %), minerals (19.6 %), proteins (8.5 %) and lipids (7.9 % *w/w* on dry basis). In comparison, samples of cultivated *Ulva clathrata* had a crude protein content ranging from 20 to 26 % and the main monosaccharides were rhamnose (36–40 %), uronic acids (27–29 %), xylose (10–13 %) and glucose (10–16 %) (Peña-Rodríguez et al. 2011). Murakami et al. (2011) aimed to elucidate the relationship between the chemical composition and the growth of *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh harvested from the Chikuzen Sea (Japan), as well as the changes in the chemical composition during pre-heating of harvested *S. horneri*. The mean chemical composition of *S. horneri* was 87.7 % moisture, 1.0 % protein, 0.1 % lipid, 3.4 % ash and 5.7 % total dietary fiber. With increased demands for renewable biofuels, the development of processes for the production of third generation biofuel from invasive algal biomass information about composition of biomass before and after hydrolysis will be useful (Wang et al. 2011).

For example, Borines et al. (2013) focused on the pretreatment, enzyme saccharification and fermentation of *Sargassum* spp. for bioethanol production. Proximate analysis of dried *Sargassum* spp. gave 10.2 % protein, 9.8 % crude fiber, 26.2 % ash and 41.8 % total carbohydrates. After hydrolysis, the amount of carbohydrate in the sample was 47.06 %, which is within the reported range of carbohydrate content of *Sargassum* species. The ash content of the sample on dry basis, 29.48 %, is lower compared to *Sargassum fulvellum* (46 %) and *Sargassum polycystum* (47.08 %), but higher than the one determined in *Sargassum vulgare* (19.43 %) (Borines et al. 2013). Much less information is available in the literature regarding the chemical composition of *S. chordalis*. Only the study of Khanzada et al. (2007) gives information on the total protein of *Solieria robusta* collected in Pakistan with a percentage between 25 and 32 %.

Hydrolysis extraction process Studies on the extraction of active compounds from natural products have attracted special attention in recent years. For industrial applications, the ideal extraction method should be quantitative, non-destructive and solvent-less, characterized also by higher extraction rate and time-saving with lower energy and cost. The potential use of enzyme treatment as a tool to improve the extraction efficiency of bioactive compounds (peptides, proteins, oligo- and polysaccharides) from seaweeds has been studied for several years and shows promising results (e.g. Samarakoon and Jeon 2012; Wijesinghe and Jeon 2012).

The present study shows that in comparison with the aqueous extraction at 50 °C for the same time (5 h), enzymatic extraction (50 °C) appears as a promising softer technique to recover proteins, neutral sugars, uronic acids and sulphate groups with a higher extraction rate, no solvent requirement and time-saving with lower cost. Access to active compounds will be different according to the preparation of the biomass. Before extraction, the conditioning (fresh, dry, lyophilized, ultrasound sonication, frozen seaweeds) and the preparation (whole or crushed seaweeds) of the biomass are starting steps in the success of enzymatic extraction. Dumay et al. (2013) showed that roughly cut wet *Palmaria palmata* provides the most interesting results in terms of extract quality and economic cost of phycoerythrin. In our study, the seaweeds were ground to pieces of about 3 mm with a hammer mill to access more easily the soluble substances. Extraction is the second important step in isolating different types of bioactive compounds from plant materials. The degradation of cell wall polysaccharide structures by appropriate enzyme treatment will be the fundamental step in the release of active components.

All the commercial enzymes tested in this study were effective in improving the extraction yield. Yield of water extraction was lower. Protease P1 and P2 gave the highest yield except for *Solieria* material where the C2 carbohydrase is more effective (Table 2, Fig. 2). In comparison, Wang et al. (2010) after 24 h of enzymatic hydrolysis obtained between 40 and 60 % extraction yield with Neutrase and higher (60 %) with carbohydrase (Viscozyme, Ultraflo and Cellulast) on the rhodophyte *P. palmata*. There are several factors that directly influence the effect of enzymes, especially the choice of the time or temperature of hydrolysis. In the studies of Heo et al. (2005), Ahn et al. (2004), Athukorala et al. (2006, 2007) and Wijesinghe and Jeon (2012), the enzymatic hydrolytic reactions were performed generally for 12 h to achieve an optimum degree of the hydrolysis. Wijesinghe and Jeon (2012) show optimum conditions for some commonly used enzymes. Depending on the enzymes, they are generally used between 40 and 60 °C and pH 3.8 and 8 for brown or red seaweeds. Wang et al. (2010) proposed enzymatic hydrolysis performed under optimal conditions of the particular carbohydrase and protease for a 24-h data. Data from this work suggest the potential of protease treatment to improve value-added utilization of *P. palmata* extracts as antioxidants in functional foods and nutraceuticals. In comparison to our study, to perform the enzyme activity at maximum level, temperature was adjusted to their optimal conditions during weather time. pH is free because very slight variations of pH were observed even without control. In the logic of an appropriate industrial application, it is important to avoid adding salts.

Numerous macroalgal species, in particular the red seaweeds, have been shown to contain significant levels of protein and, in some cases, contain higher quantities than some conventional protein-rich foods such as soybean, cereals, eggs and fish (Fleurence et al. 2012) as well as the bioactive potentials of specific lectins, enzymes and protein derivatives such as peptides. Seaweeds traditionally consumed in Asian countries as sea vegetables seem to be a suitable source of proteins for human nutrition. The role of proteins as physiologically active components in the diet is being increasingly acknowledged (Harnedy and FitzGerald 2013; Stengel et al. 2011; Fleurence et al. 2012). Harnedy and FitzGerald (2013) used polysaccharidases as prior treatment of *P. palmata* cells for protein extraction 30 min at 40 °C.

The primary structure of natural proteins consists of particular amino acid sequences that have the ability to exert physiological benefits in human beings. Macroalgae contain relatively high protein levels (10–47 % dw; Fleurence 1999); however, protein content is dependent on season and on the collection site and is linked to variables including nutrient supply. Levels in red macroalgae commonly reach up to 47 % dw, with green and brown macroalgae typically containing lower levels of 9–26 % dw and 3–15 % dw, respectively (Harnedy and FitzGerald 2013; Stengel et al. 2011).

Depending on the enzymes used, hydrolysates extracted from *Ulva* sp. biomass showed the following composition: 9.92±0.03 % dw protein, 21.09±3.98 % dw neutral sugars, 18.57±1.15 % dw uronic acids and 18.04±0.5 % dw sulphate groups. In comparison, Fleurence (1999) and Castro et al. (2006) showed that enzymatic transformation of Ulvales biomass could increase both the algal protein availability and digestibility, and ulvan degradation to oligosaccharides could be beneficial for stimulating animal defences against diseases. *Ulva rigida* ulvan as polymer can stimulate macrophage activities against pathogens and contribute to disease resistance in fish. Ulvan also has the capacity to intercalate into clay with applications in animal feed detoxification (Demais 2006a, b). This characteristic opens the way for the preparation of novel interesting nanocomposites for applications in many different areas.

The algal powder from *Solieria* sp. had the following composition: 15.2±0.3 % dw protein, 36.8±0.5 % dw neutral sugars, 22.1±0.9 % dw uronic acids and 5.0±0.3 % dw sulphate groups. *Sargassum* sp. material had the following composition: 53.8±2.1 % dw protein, 36.07±4.37 % dw neutral sugars, 26.41±1.87 % dw uronic acids and 16.12± 0.04 % dw sulphate groups. Enzymatic hydrolysis degrades the cell wall and gives access to molecules which are not initially available. The use of enzymatic liquefaction of red seaweeds already described in the literature could be an alternative procedure to improve protein solubilization, especially PBP, in mild conditions (Lahaye and Vigouroux 1992; Fleurence et al. 1995a, b). Studies are being performed to understand the physical conditions needed to improve the stability of PBP especially those extracted from *P. palmata*. Amano and Noda (1990) and Wijesinghe and Jeon (2012) reported the use of algal cell wall degradation enzymes to facilitate the extraction of proteins from the red alga *Porphyra* (*Pyropia*) *yezoensis*. Further, they demonstrated the use of an enzymatic mixture, including digestive enzymes to improve protein accessibility. In addition, the technique was tested on several algae including *U. pertusa*, *Laminaria* (*Saccharina*) *japonica* and *Kallymenia perforata*, and significant differences were obtained in protein composition for all the treated seaweeds (Amano and Noda 1992). Fleurence et al. (1995a, b) reported that the simultaneous application of carrageenase and cellulase activities on the red alga *Chondrus crispus* led to a tenfold increase in extraction efficiency of the proteins. Further, they demonstrated that the combined use of agarase and cellulase on another red alga *Gracilaria verrucosa* led to a threefold increase in protein yield. Cian et al. (2012) showed that several hydrolysates obtained using trypsin, alcalase and a combination of both sequentially added from a first cold water protein extract derived from *Porphyra columbina* were enriched in peptides.

Seaweeds appear to be good sources of active polysaccharides having great chemical, physico-chemical and rheological diversities (Lahaye 1991). Unfortunately, seaweeds contain high viscosity parietal polysaccharides which are an antinutritional factor limiting the digestibility of protein fractions, and extraction of protein from most seaweeds is difficult due to the presence of large amounts of polysaccharides and phenolic compounds. The main plant proteins used in animal nutrition are soybean proteins which have different problems such as digestibility, non-adapted enzymatic system for the degradation of these proteins or environmental and ecological problem like the requirement for large quantities of fresh water and the question of genetically modified soybeans (Fleurence et al. 2012). The use of seaweeds in the diet of terrestrial or marine farm animals has already been described (Hansen et al. 2003; Fleurence et al. 2012). Numerous studies have reported the beneficial effects of the use of seaweed meal in the diet of fish or mollusks such as abalone. The positive effect of *Ulva* meal or wet feed including alginates on the immune status of fish such as sea bream or Atlantic salmon has been well known for 20 years (Fleurence et al. 2012). The insoluble fibers are found in small proportions in the form of cellulosic fractions. The soluble fibers or phycocolloids are better represented as follows: in the red seaweeds, 51–56 % by agars, carrageenans and xylans; in the green seaweeds, 51–56 % by ulvans, rhamnans and arabinogalactans; and in the brown seaweeds, 67–87 % by laminarans (β-glucans), alginates and fucans. Generally, these polysaccharides have been extracted using water or polar organic solvents. However, since the cell wall consists of complex polymers, it is not easy to extract active polysaccharides using a solvent extraction

process. These polysaccharides are little or non-degraded by digestive enzymes in the human intestine. Nevertheless, the polysaccharides are degraded by some types of carbohydrases derived from microorganisms. Those enzymes can convert water-insoluble seaweeds into water-soluble materials. The production of different bioactive polysaccharides and oligosaccharides with enzymatic digestion is required in order to increase the extraction efficiency of more functional ingredients from seaweeds (Wijesinghe and Jeon 2012). Enzymatic hydrolysis can be employed as an alternative method to improve the extraction efficiency of bioactive polysaccharides from seaweeds. Polysaccharides from red and brown algae, particularly the laminarin, as well as the carrageenan and the alginate, have been extensively studied due to their elicitor properties on plants natural defences, and only a few studies were carried out on green algae (Lahaye and Robic 2007).

Phenolic compounds are known to be the dominant secondary metabolites in temperate brown seaweeds and may amount up to 30 % dw (Plouguerné et al. 2006). Some phenolic compounds, such as phlorotannins in brown seaweeds, also exhibit primary functions, e.g. in growth and the development of the cell wall in Fucales. Commonly characterized as stress compounds, phenolics are involved in the chemical protective mechanisms against biotic factors (Stengel et al. 2011). Enzymatic extraction of seaweeds for the purpose of obtaining natural antioxidant substances would provide several potential advantages: water solubility, simple and large-scale production process of antioxidant extracts from seaweeds. Although vitamin C is water-soluble (but heat-sensitive and easily denatured), natural antioxidants like carotenoids, phenolic compounds and vitamin E presented some disadvantages because they are water-insoluble. Heo et al. (2005) have shown potential antioxidative activities of enzymatic extracts from seven species of brown seaweeds *Ecklonia cava*, *Ishige okamurae*, *Sargassum fullvelum*, *S. horneri*, *Sargassum coreanum*, *Sargassum thunbergii* and *Scytosiphon lomentaria*. Ultraflo carbohydrase and alcalase protease extracts of *S. horneri* were dose-dependent and thermally stable. They exhibited strong hydrogen peroxide scavenging activities. The effect of various protease and carbohydrase treatments on the extraction of polyphenols and other antioxidant ingredients from the red alga *P. palmata* was investigated by Wang et al. (2010). Proteases were more effective than carbohydrases and Umamizyme peptidase extract exhibited the greatest scavenging activity against DPPH and peroxyl radicals. The use of different in vitro antioxidant tests verified the complexity of the antioxidant effects of the seaweed hydrolysates. Crude polyphenols contributed greatly to the peroxyl radical scavenging properties of Umamizyme extract, whereas crude polysaccharides appeared to be more potent metal chelators in experiments. Treatment of *P. palmata* by Umamizyme improves versatile application of extracts as natural antioxidants and functional food ingredients (Wang et al. 2010). In our study, the relatively lower total polyphenol of hot water, protease and carbohydrase extracts could be partly due to the formation of protein polyphenol complexes during the extraction. When the algal cell wall is disrupted, the intracellular constituents including proteins are released from the cells, which are prone to complex with polyphenols, leading to aggregation and ultimate precipitation (Siriwardhana et al. 2008). Many studies have investigated the mechanisms of polyphenol–protein interactions. Potentially, polyphenols may interact with proteins via hydrogen bonding, p-bonding, hydrophobic interactions, ionic and covalent linkage. Although much less information is available in the literature regarding the complexation of algal polyphenols with proteins, strong interactions between phlorotannins (the largest group of polyphenols present in brown algae) and proteins were reported by Stern et al. (1996). Another explanation for the decreased total polyphenol in carbohydrase extracts could be due to the release of oligosaccharides and simple sugars during the degradation of cell wall polysaccharides, resulting in lower overall levels of polyphenols in the extracts (Siriwardhana et al. 2008).

Evaluation of antiherpetic activities

Screening assays of the antiviral activity of many extracts have led to the identification of a number of polysaccharides (Bergé et al. 1999; Harden et al. 2009; Bouhlal et al. 2010, 2011), the diterpenes (El Gamal 2010) or glycolipides (Vo et al. 2011) having potent inhibitory effects against *Herpes simplex* virus (HSV) type 1. However, no screening assays of antiviral activity have been carried out for enzymic extracts. Only fractions extracted from *S. chordalis* present antiviral activities. Fractions obtained by hot water extraction and carbohydrase (C3) hydrolysis with *S. chordalis* biomass have an effective antiviral activity with EC_{50} 23.0 and 29.3 μg mL^{-1} for a MOI of 0.001 ID_{50}/cells, respectively, without any cytotoxicity effect. The activity corresponds to fractions rich in sulfates groups (4.7±0.2 % and 5.0±0.3 %, respectively). The importance of red macroalgae as a source of novel anti-HSV agents has been recognized and reported by many researchers (Vo et al. 2011; Bouhlal et al. 2010, 2011). It was revealed that the aqueous extracts rich in sulfate content (Bourgougnon et al. 1993, 2003; Damonte et al. 2004) were capable of inhibiting the replication of HSV-1 at an EC_{50} range of 2.5–80 μg mL^{-1} without cytotoxic effect. It has been known that marine red macroalgae contain significant quantities of sulphated polysaccharides such as xylomannan, galactans and carrageenans that exhibited potent antiherpetic activity at the EC_{50} range of 0.3–10.0 μg mL^{-1}. We can suppose that the hydrolysates are rich in sulphated oligosaccharides or polysaccharides. Bondu et al. (2010) showed that carrageenan extracted from *S. chordalis* proved to be devoid

of direct cytotoxicity on Daudi (human Burkitt's lymphoma), Jurkat (human leukaemic T-cell lymphoblast) and K562 (human chronic myelogenous leukaemia) cell lines and showed great immunostimulating properties (enhancement of neutrophil phagocytosis, cytotoxicity by natural killer cells, antibody-dependent cell cytotoxicity and stimulation of lymphocyte proliferation). However, no antiviral activity was ever detected in an extract of *S. chordalis*.

In conclusion, the present study shows that in comparison with the aqueous extraction realized in 50 °C for the same time (5 h), enzymatic extraction (50 °C) appears as a promising softer technique to recover some compounds and is solventless, has higher extraction rate and is time-saving with lower cost. After 5 h of enzymatic hydrolysis, the behaviour and the selectivity of enzymes on the biomass are different with the type of raw material and the choice of enzyme. All the commercial enzymes tested in this study were effective in improving the extraction yield and the quality of bioactive compounds, but to a different extent compared with water extraction. But enzymatic hydrolysis seems to be less effective for polyphenol extraction and analysis in our choice of the conditions of hydrolysis. Cheap and food grade enzymes could be explored in the future to extract new commercial compounds from algal biomass. Enzymatic extraction tool of bioactive components appears as a useful approach for recovery of industrially important metabolites from invasive seaweeds. Some fractions obtained from *S. chordalis* present good antiherpetic activities. Further research is underway to determine the structure and nature of the active fractions to establish structure–activity relationships. At the same time, research on potential antioxidant activities to find new useful functional food ingredients and antibacterial activities to find new antifouling compounds is in progress to value the obtained extracts.

References

Ahn CB, Jeon YJ, Kang DS, Shin TS, Jung BM (2004) Free radical scavenging activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Scytosiphon lomentaria* by electron spin resonance spectrometry. Food Res Int 37:253–258

Amano H, Noda H (1990) Proteins of protoplasts from red alga *Porphyra yezoensis*. Nippon Suisan Gakkaishi 56:1859–1864

Amano H, Noda H (1992) Proteins of protoplasts from several seaweeds. Nippon Suisan Gakkaishi 58:291–299

Arzel P (1987) Les Goémoniers. Le Chasse-Marée, Editions de l'estran. Douarnez, France, 305 pp

Arzel P (2000) Sur la route des Algues, les goémoniers. Patrimoine maritime de Bretagne. Ed. Uhel Izel, 65 pp

Arzel P, Barbaroux O (2003) Les Algues, produits, saveurs et santé de la mer. Ed. Libris, 104 pp

Athukorala Y, Jung WK, Vasanthan T, Jeon YJ (2006) An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. Carbohydr Polym 66:184–191

Athukorala Y, Lee KW, Kim SK, Jeon YJ (2007) Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. Bioresour Technol 98:1711–1716

Bergé JP, Bourgougnon N, Alban S, Pojer F, Chermann JC, Billaudel S, Robert JM, Durand P, Franz G (1999) Antiviral and anticoagulant activities of a water soluble compound extracted from the marine diatom *Haslea ostrearia*. Planta Med 65:604–609

Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. Anal Biochem 54:484–489

Bondu S, Deslandes E, Fabre MS, Berthou C, Guangli Y (2010) Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. Carbohydr Polymers 81:448–460

Borines MG, de Leon RL, Cuello JL (2013) Bioethanol production from the macroalgae *Sargassum* spp. Bioresour Technol 138:22–29

Bouhlal R, Riadi H, Bourgougnon N (2010) Antiviral activities of Morocco seaweeds extracts. Afr J Biotechnol 9:7968–7975

Bouhlal R, Haslin C, Chermann JC, Colliec-Jouault S, Sinquin C, Simon G, Cerantola S, Riadi H, Bourgougnon N (2011) Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophytha, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). Mar Drugs 7:1187–1209

Bourgougnon N (2003) Anti-HIV compounds from red seaweeds. In: Fingerman M, Nagabhushanam R (eds) Biomaterials and bioprocessing, vol 9, Recent advances in marine biotechnology. Science, Enfield, pp 16–206

Bourgougnon N, Stiger-Pouvreau V (2011) Chemodiversity and bioactivity within red and brown marine macroalgae along French coasts, Metropole and overseas departments and territories. In: Kim S-K (ed) Handbook of marine macroalgae: Biotechnology and applied phycology. Wiley, Chichester, pp 58–105

Bourgougnon N, Lahaye M, Chermann JC, Kornprobst JM (1993) Composition and antiviral activities of sulfated polysaccharide from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales). Bioorg Med Chem Lett 3:1141–1146

Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP (2007) Metabolites from algae with economical impact Comp. Biochem Physiol C 146:60–78

Castro R, Piazzon MC, Zarra I, Leiro J, Noya M, Lamas J (2006) Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. Aquaculture 254:9–20

Cian RE, Martínez-Augustin O, Drago SR (2012) Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. Food Res Internat 49:364–372

Crooke WM, Simpson WE (1971) Determination of ammonium in Kjeldahl digests of crops by an automated procedure. J Agric Food Chem 27:1256–1262

Damonte EB, Matulewicz MC, Cerezo AS (2004) Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. Curr Med Chem 11:2399–2419

Demais H, Brendle J, Jaber M, Laza Anca L (2006a) Exfoliating an intercalated clay, useful in e.g. animal/human feeds, plastification, surface coatings and in nanocomposite, comprises preparing intercalated clay from clay and intercalating compound and lyophilizing in presence of water. French Patent FR2882997

Demais H, Brendle J, Le Deit H, Laza Anca L, Lurton L, Brault D (2006b) Interspersed clay. PCT Patent Application WO2006030075

Dizerbo AH, Herpé E (2007) Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique Iles Normandes incluses Éditions Anaximandre Landemau, 315 pp

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 28:350–356

Dumay J, Clément N, Morançais M, Fleurence J (2013) Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction. Bioresour Technol 131:21–27

El Gamal AA (2010) Biological importance of marine algae. Saudi Pharm J 18:1–25

Fleurence J (1999) Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. Trends Food Sci Technol 10:25–28

Fleurence J, Massiani L, Guyader O, Mabeau S (1995a) Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa* and *Palmaria palmata*. J Appl Phycol 7:393–395

Fleurence J, Le Cœur C, Mabeau S, Maurice M, Landrein A (1995b) Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata*. J Appl Phycol 7: 577–582

Fleurence J, Morançais M, Dumay J, Decottignies P, Turpin V, Munier M, Garcia-Bueno N, Jaouen P (2012) What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture? Trends Food Sci Technol 27:57–61

Hansen HR, Hector BL, Feldmann J (2003) A qualitative and quantitative evaluation of the seaweed diet of North Ronaldsay sheep. Anim Feed Sci Technol 105:21–28

Harden EA, Hartline C, Falshaw R, Carnachan SM, Kern ER, Prichard MN (2009) Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. Antivir Res 83:282–289

Harnedy PA, FitzGerald RJ (2013) Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. Food Sci Technol 51:375–382

Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ (2005) Anti oxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. Bioresour Technol 96: 1613–1623

Ioannou E, Roussis V (2009) Natural products from seaweeds. Springer, Berlin, pp 51–81

Jaques LB, Ballieux RE, Dietrich CP, Kavanagh LW (1968) A micro-electrophoresis method for heparin. Can J Physiol Pharmacol 46: 351–360

Khanzada AK, Kazi WSTG, Kabir S, Soofia S (2007) Antifungal activity, elemental analysis and determination of total protein of seaweed, *Solieria robusta* (Greville) Kylin from the coast of Karachi. Pak J Bot 39:931–937

Lahaye M (1991) Marine algae as sources of fibres: determination of soluble and insoluble dietary fibre contents in some "sea vegetables". J Sci Food Agric 54:587–594

Lahaye M, Robic A (2007) Structure and functional properties of ulvans, a polysaccharide from green seaweeds. Biomacromolecules 8: 1765–1774

Lahaye M, Vigouroux J (1992) Liquefaction of dulse (*Palmaria palmata* (L.) Kuntze) by a commercial enzyme preparation and purified endo-β-1,4-d-xylanase. J Appl Phycol 4:329–337

Langlois M, Allard JP, Nugier F, Aymard M (1986) A rapid and automated colorimetric assay for evaluating in the sensitivity of *Herpes simplex* strains to antiviral drugs. J Biol Stand 14:201–211

Mayer AMS, Rodríguez AD, Berlinck RGS, Hamann MT (2007) Marine pharmacology in 2003–4: marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. Comp Biochem Physiol C 145:553–581

McLaren C, Ellis MN, Hunter GA (1983) A colorimetric assay or the measurement of the sensitivity of *Herpes simplex* viruses to antiviral agents. Antivir Res 3:223–234

Mohamed S, Hashim SN, Rahman HA (2012) Seaweeds: a sustainable functional food for complementary and alternative therapy. Trends Food Sci Technol 23:83–96

Murakami K, Yamaguchi Y, Noda K, Fujii T, Shinohara N, Ushirokawa T, Sugawa-Katayama Y, Katayama M (2011) Seasonal variation in the chemical composition of a marine brown alga, *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh. J Food Compos Anal 24: 231–236

Peña-Rodríguez A, Mawhinney TP, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE (2011) Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. Food Chem 129:491–498

Plouguerné E, Le Lann K, Connan S, Jechoux G, Deslandes E, Stiger-Pouvreau V (2006) Spatial and seasonal variations in density, maturity, length and phenolic content of the invasive brown macroalga *Sargassum muticum* along the coast of Western Brittany (France). Aquat Bot 85:337–344

Ray B, Lahaye M (1995) Cell-wall polysaccharide from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta)—extraction and chemical composition. Carbohydr Res 274:251–261

Robic A, Sassi JF, Lahaye M (2008) Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (Chlorophyta) on the extraction yield, the physico-chemical and rheological properties of ulvan. Carbohydr Polym 74:344–352

Samarakoon K, Jeon YJ (2012) Bio-functionalities of proteins derived from marine algae—a review. Food Res Int 48:948–960

Sassi AB, Harzallah-Skhiri F, Bourgougnon N, Aouni M (2008) Antiviral activity of some Tunisian medicinal plants against *Herpes simplex* virus type 1. Nat Prod Res 22:53–65

Siriwardhana N, Kim KN, Lee KW, Kim SH, Ha JH, Song CB (2008) Optimisation of hydrophilic antioxidant extraction from *Hizikia fusiformis* by integrating treatments of enzymes, heat and pH control. Int J Food Sci Technol 43:587–596

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150:76–85

Stengel DB, Connan S, Popper ZA (2011) Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. Biotech Adv 29:483–501

Stern JL, Hagerman AE, Steinberg PD, Mason PK (1996) Phlorotannin–protein interactions. J Chem Ecol 22:1877–1899

Tavennec M (2009) La gestion d'une problématique algale dans un secteur hautement touristique, la presqu'île de Rhuys. Masters Thesis, Université de Nantes, 107 pp

Turkmen N, Sari F, Velioglu YS (2005) The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. Food Chem 93:713–718

Vo TS, Ngo DH, Ta QV, Kim SK (2011) Marine organisms as a therapeutic source against herpes simplex virus infection. Eur J Pharm Sci 44:11–20

Wang T, Jónsdóttir R, Kristinsson HG, Hreggvidsson GO, Jónsson JÓ, Thorkelsson G, Ólafsdóttir G (2010) Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*. Food Sci Technol 43:1387–1393

Wang X, Liu X, Wang G (2011) Two stage hydrolysis of invasive algal feedstock for ethanol fermentation. J Integr Plant Biol 53:246–253

Wijesinghe WAJP, Jeon Y-J (2012) Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: a useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: a review. Fitoterapia 83:6–12

Yaich H, Garna H, Besbes S, Paquot M, Blecker C, Attia H (2011) Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. Food Chem 128:895–901

Annexe 3. **Etude de la variabilité saisonnière chez *Ascophyllum nodosum***

De nombreux travaux ayant déjà traité de la variabilité en composés phénoliques chez l'espèce de macroalgue brune *Ascophyllum nodosum*, nous avons décidé de présenter ces résultats en annexe. Ainsi comme pour *Sargassum muticum* au paragraphe IV.2, nous présenterons les variabilités temporelles en composés phénoliques chez *A. nodosum*. Les résultats seront comparés à ceux obtenus chez *S.muticum*.

Matériels et méthodes

Afin de comparer la composition en composés phénoliques chez *Ascophyllum nodosum* au cours de l'année nous nous sommes placés sur un même site d'échantillonnage afin de nous placer dans les mêmes conditions environnementales. Les échantillonnages ont été réalisés durant les trois ans de thèse de fin Septembre 2010 à Juillet 2013 sur le site du Dellec (*cf.* Chapitre I). Un échantillonnage saisonnier a été réalisé. Ainsi les algues ont été récoltées en automne (mi-Septembre), hiver (mi-Janvier), printemps (mi-Avril, mi-Juin) et en été (mi-Juillet). Lors de la collecte des algues, les crampons ont été laissés en place. Les thalles ont été rincés à l'eau claire avant d'être lyophilisés et broyés. La poudre obtenue a été utilisée pour les différents tests.

Des analyses *in vivo* de RMN ont été réalisées à l'aide d'une sonde HR-MAS 1H/31P sur le spectromètre BRUKER DRX Advanced 500 (500 MHz) (Service commun de RMN-RPE de l'UBO) (*cf.* Encadré I.1). Nous avons pu ainsi comparer les spectres obtenus pour les différentes saisons d'échantillonnage.

Résultats

D'après la Figure A.2, on constate une variation significative de la teneur en composés phénoliques selon la période d'échantillonnage chez *Ascophyllum nodosum* (Tukey HSD, $p<0.001$) (Tableau A.1). L'effet seul de l'année d'échantillonnage ne semble pas avoir d'effet significatif (p=0.116) alors que la saison a un effet significatif ($p<0.001$). La quantité de composés semble la plus faible aux mois de Janvier et Avril (3.0±0.17 et 3.4±0.25 $\%MS_{algue}$ en moyenne pour les mois de Janvier et Avril, respectivement) tandis qu'elle est maximum au alentour du mois de Juillet (4.43±0.31 $\%MS_{algue}$ en moyenne) (Figure A.2). Si on considère les deux espèces étudiées dans cette thèse, on remarque une plus grande variabilité de la teneur en composés phénolique chez *Sargassum muticum* au cours de l'année alors que chez *Ascophyllum nodosum* cette variation est moins importante : on passe de 3.00 ± 0.17 à 4.43 ± 0.31 $\%MS_{algue}$. D'autre part la teneur en CP est, en moyenne, bien plus importante chez *Ascophyllum nodosum* (3.74 ± 0.54 $\%MS_{algue}$) que chez *S.muticum* (1.93 ± 1.28 $\%MS_{algue}$) (paragraphe IV.2 Figure IV.1 et Tableau IV.2).

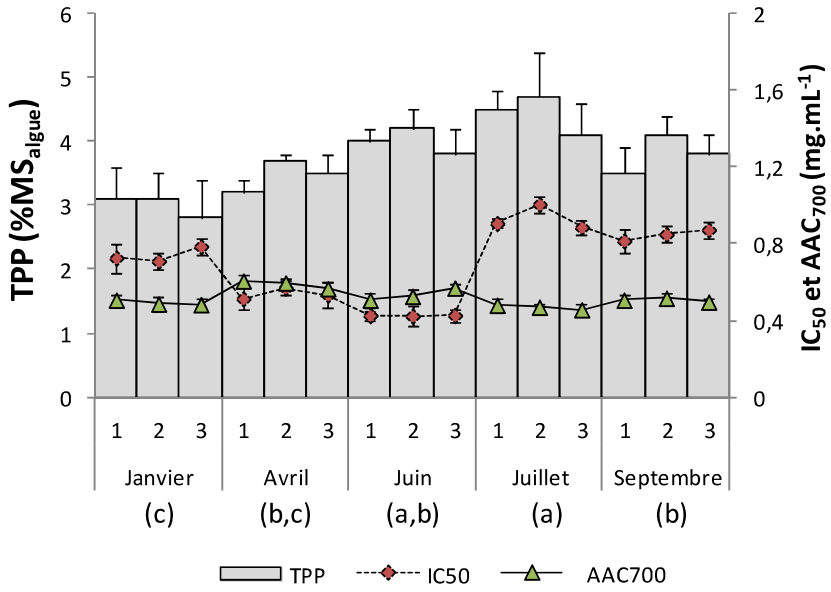


Figure A.2.Teneurs en composés phénoliques (histogramme) et activités antiradicalaire et antioxydante avec la méthode DPPH (IC_{50}) et β-carotène (AAC700) mesurées à différent mois sur 3 ans pour *Ascophyllum nodosum*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type tandis que les lettres représentent les différences significatives (Tukey HSD, p<0.05) entre les mois d'échantillonnage pour les teneurs en CP (sans tenir compte de l'année).

Tableau A.1. Effet de la période d'échantillonnage sur les teneurs en composés phénoliques et les activités associées (anti-oxydantes et anti-radicalaires)

Variable	Test satistique		*A. nodosum*	
			Année	Mois (Année)
TPP	Two-Way nested ANOVA	df	2	12
(%MS_{algue})		F	2.313	6.377
		p	0.116	*p<0.001*
IC_{50}	Two-Way nested ANOVA	df	2	12
($mg.mL^{-1}$)		F	2.114	60.167
		p	0.138	*p<0.001*
AAC_{700}	Two-Way nested ANOVA	df	2	12
($mg.mL^{-1}$)		F	0.080	8.410
		p	0.921	p<0.001

Concernant l'activité anti-oxydante, l'AAC_{700} varie de façon significative (Tableau A.1) selon la période d'échantillonnage pour la macroalgue *A.nodosum*. Chez *A.nodosum* seul le mois d'échantillonnage a un effet significatif sur l'activité antioxydante des composés (*p<0.001*), l'année ne semble pas avoir d'effet (p=0.138). Les composés sont moins actifs au mois d'Avril (0.59 ± 0.02 $mg.mL^{-1}$) et les plus actifs au mois de Septembre (0.47 ± 0.01 $mg.mL^{-1}$). L'activité antiradicalaire, mesurée par l'IC_{50} est significativement différente (Tableau A.1) selon les mois d'échantillonnages (p<0.001) en revanche l'année n'a pas d'effet significatif sur les activités antiradicalaires mesurée (p=0.901). Chez *A.nodosum* le maximum d'activité est mesuré en Avril (IC_{50} de 0.43 ± 0.01 $mg.mL^{-1}$) (Figure IV.3) et le minimum en Juillet (IC_{50} de 0.93 ± 0.06 $mg.mL^{-1}$) (Figure A.2).

Sur les spectres présentés en Figure A.3, on peut voir que les composés phénoliques sont visibles (et donc en proportion plus importante) à partir du mois d'avril et jusqu'au mois de Juillet. On remarque en septembre la présence de petits signaux dans la zone des composés aromatiques mais étant donné la présence d'épiphytes en quantité importante sur les thalles à cette période de l'année, ces signaux pourraient correspondre à des CP présent chez les espèces épiphytes. Les tendances observées ici suivent celles mesurées par dosage Folin-Ciocalteu.

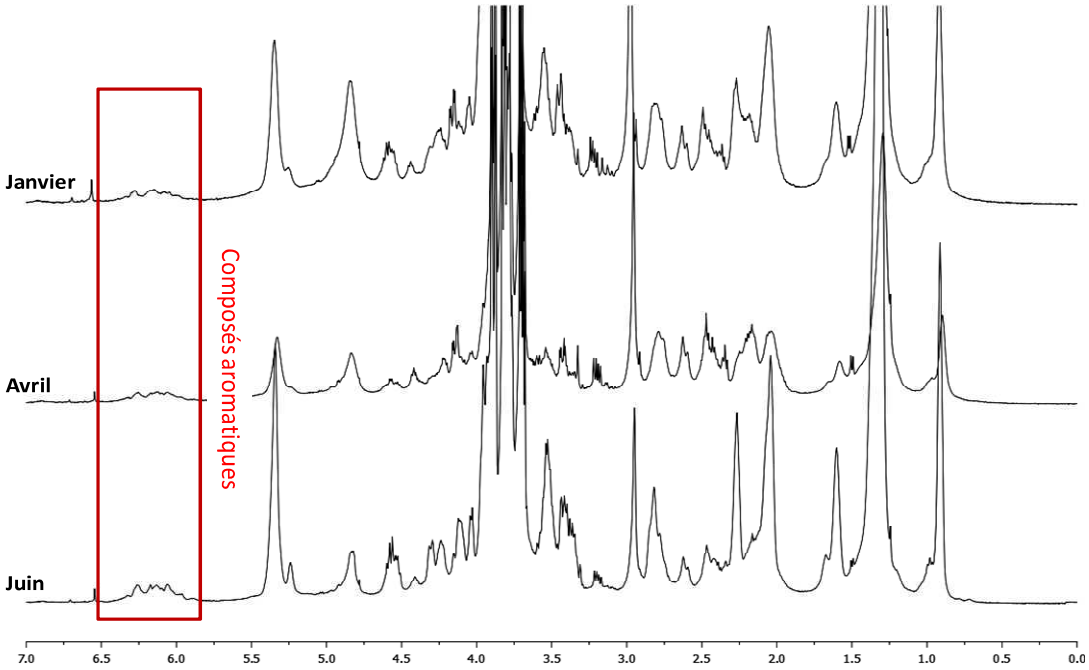


Figure A.3. Spectres RMN-HRMAS sur des morceaux de thalle d'*Ascophyllum nodosum* lyophilisés. La zone encadrée correspond à la zone des composés aromatiques.

Chez *Ascophyllum nodosum* (Figure A.3) les composés sont en quantité suffisante pour être visualisés sur les spectres HRMAS toute l'année. On remarque cependant des signaux plus intenses au mois de Juin ce qui correspond également aux observations faites lors du dosage Folin-Ciocalteu des CP. Par ailleurs, même en hivers, la quantité de CP semble rester relativement importante.

Discussion

Les teneurs en composés phénoliques chez les deux espèces échantillonnées sur ces trois ans d'étude : *Ascophyllum nodosum* et *Sargassum muticum* ne varient pas ou peu d'une année sur l'autre. Ainsi, pour *A. nodosum* ces variations ne sont pas significatives alors que chez *Sargassum muticum* un effet de l'année de récolte est observé. Durant l'année 2011 la teneur en CP est significativement plus importante pour cette espèce et cet effet est visible à partir du printemps. Si on s'intéresse aux conditions environnementales et particulièrement au climat durant cette période on se rend compte que le printemps et l'été 2011 ont été particulièrement chauds et ensoleillés ce qui pourrait expliquer cette augmentation de la teneur en composés ayant des effets photoprotecteurs connus (*cf.* Chapitre I). Si on compare les teneurs obtenues chez ces deux Fucales au cours de l'année, on remarque que l'espèce *Ascophyllum nodosum* présente des teneurs bien plus importantes que *Sargassum muticum*

(Figure IV.1 du chapitre IV). Les teneurs mesurée chez *Ascophyllum nodosum* provenant du site du Dellec sont pourtant très inférieures à celle ayant été mesurées dans d'autres études. Ainsi, Connan (2004) avait observé des teneurs supérieures à 10%MS chez cette espèce en été en Bretagne. La différence de localisation pourrait expliquer en partie les différences observées.

Les teneurs en composés phénoliques varient également en fonction de la saison chez les deux espèces étudiées ce qui vient confirmer les études précédemment effectuées sur ces deux espèces par d'autres auteurs (Connan, 2004 ; Plouguerné *et al*., 2006, Le Lann, 2009). Les teneurs maximales sont atteintes un peu après la période de reproduction chez *Ascophyllum nodosum* (Connan, 2004). L'augmentation de la teneur en CP est, par ailleurs, initiée aux alentour du printemps ce qui confirme l'hypothèse du rôle photoprotecteur des phlorotannins déjà mis en évidence par de nombreux auteurs (Pavia *et al.,* 1997 ; Henry et Van Alstyne, 2004 ; Fairhead *et al.,* 2006 ; Abdala-Díaz *et al.,* 2006 ; Plouguerné *et al.,* 2006). Par ailleurs, ce rôle protecteur lors de la reproduction ne suffit pas à expliquer les teneurs élevées chez *A.nodosum* en été par exemple, la période de reproduction étant plutôt au printemps (*cf.* Chapitre I). D'autres paramètres peuvent par ailleurs expliquer cette variabilité saisonnière, comme par exemple certains paramètres du milieu tels que la salinité, la température de l'eau ou encore l'intensité lumineuse. Des études ont montré pour l'espèce *A. nodosum* un effet significatif de l'intensité lumineuse sur la saisonnalité des variations observées au niveau du contenu phénolique (Connan, 2004).

En ce qui concerne les activités anti-radicalaires, celles-ci sont maximales également en été dans les extraits des deux espèces récoltées. Chez *Ascophyllum nodosum*, de précédentes études faisaient état d'une augmentation de l'activité en automne et au printemps correspondant à la période de reproduction chez cette espèce (Connan, 2004) ; nos résultats sont comparable puisqu'on observe une augmentation de l'activité antiradicalaire au milieu du printemps, celle-ci reste également importante au début de l'été. Des études ont par ailleurs montré que les activités mesurées chez cette espèce étaient supérieures dans les parties fertiles du thalle (Connan, 2004). L'activité biologique des composés serait donc bien liée à la fonction de reproduction. Ainsi, *les deux espèces* semblent assurer la protection de leurs latérales fertiles, et par là même, assurer leur dispersion, en produisant des composés de défense.

L'activité antioxydante des échantillons moins sensible aux variations saisonnières. Même si, pour *A.nodosum,* contrairement à *S.muticum,* un effet significatif du mois d'échantillonnage est observé : les composés lipophiles sont plus actifs en Septembre et en Janvier. Les variations de l'activité antiradicalaire ne suivent donc pas la même tendance que celles de la teneur en composés phénoliques.

Conclusion

Nous avons montré que les composés phénoliques des Phaeophycées étudiées et en particulier de *Sargassum muticum* variaient quantitativement et qualitativement en fonction de plusieurs paramètres (variabilité spatiale et temporelle) et ce, à différentes échelles. Cette étude a permis de confirmer les résultats précédemment obtenus dans d'autres études.

Annexe 4. **Détection de la présence de *Vibrio harveyi* sur *Sargassum muticum***

Une autre manière de vérifier l'effet anti bactérien de *Sargassum muticum* était de mesurer la présence ou l'absence d'une souche bactérienne, ici *Vibrio harveyi* sur les thalles de l'algue. L'absence de *V. harveyi* permettant de déduire une probable production de molécules anti-bactériennes par la Sargasse. Il s'agissait d'extraire l'ADN total de l'algue et d'amplifier génétiquement les fragments caractéristiques de cette souche bactérienne. Cette expérience n'a été faite que sur les algues provenant de France (algues récoltées sur le site du Dellec en Juillet 2011, *cf.* Chapitre I). Cette étude a été réalisée dans le cadre du stage de Master 2 de Mr. Thomas Guérin (Guérin, 2012).

Matériel et méthodes

Extraction de l'ADN total :

Sur les algues fraîches, de fins morceaux de thalle sont découpés puis transférés dans un tube eppendorf contenant 100µL de Triton X-100 à 1%. Après 10 min d'incubation, les échantillons sont vortexés et chauffés à 100°C pendant 10 min. Une centrifugation (4°C, 14000 rpm, 5 min) permet de séparer le surnageant qui sera récupéré du culot contenant les débris d'algues non utilisés.

Amplification génique par PCR :

Les deux amorces utilisées permettent d'amplifier une région présente chez de nombreux organismes et notamment dans l'ADN de *Vibrio harveyi* ou de *V. tapetis* :

Amorce sens : Vh_toxR-F (5'- TTC TGA AGC AGC ACT CAC -3')

Amorce anti-sens : Vh_toxR-R (5'- TCG ACT GGT GAA GAC TCA -3')

Le mélange réactionnel d'amplification est composé d'eau distillée stérile, du tampon de réaction, des dNTP nécessaires à l'amplification de l'ADN, de $MgCl_2$, des amorces sens et anti-sens, de l'ADN à amplifier et de la Taq polymérase (enzyme nécessaire à l'élongation et donc à l'amplification). Après 10 min de dénaturation à 98°C, 40 cycles de PCR sont effectués. Enfin les échantillons subissent une étape d'élongation finale de 5 min à 72°C (figure IV.37). Enfin, une migration des produits d'amplifications obtenus est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose (agarose 1% contenant du BET à 0.5 $mg.mL^{-1}$, du tampon TAE 1X) pendant 2h à voltage constant (110 A). Les fragments d'ADN, colorés au BET sont visualisé sous exposition aux UV. Afin de connaitre la taille des fragments visualisés un marqueur de taille de 100 paires de base est ajouté dans le premier puits.

Afin d'avoir une idée des pathogènes présents sur les thalles des algues étudiées, des extraits de différentes souches de *V. harveyi* et de *V. tapetis* ont été traités de la même manière. Les signaux obtenus après migrations permettront, par comparaison avec ceux obtenus sur les échantillons algaux, de savoir si cette souche était présente en biofilm sur les thalles.

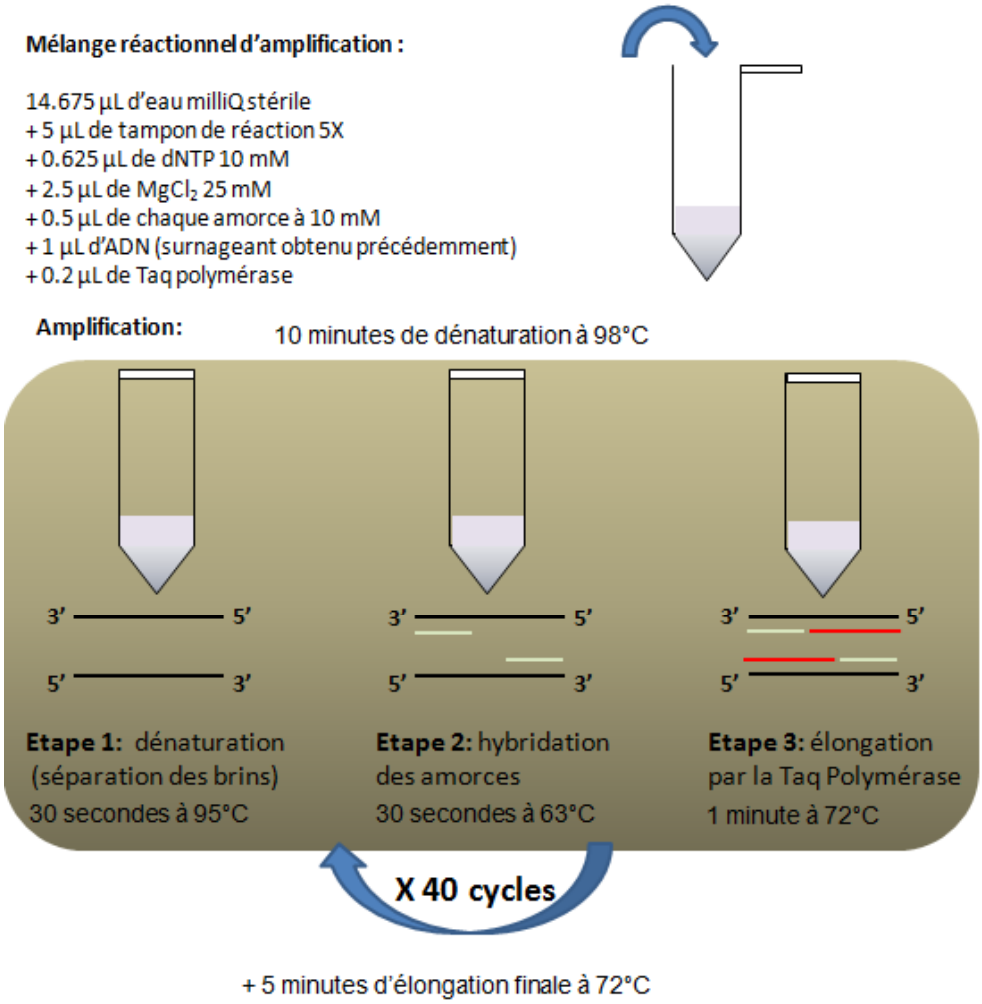


Figure A.4.Technique d'amplification par PCR employée

Résultats et discussion

La figure IV.38 nous montre le gel obtenu après migration des fragments amplifiés pour chacun des échantillons. On remarque, au niveau des témoins bactériens que les souches 7890 et ORM4 de *V. harveyi* présentent une bande unique de même taille. *V. tapetis*, en revanche présente plusieurs bandes, il donc différenciable de *V. harveyi* grâce à ces mêmes sites de restriction. Par ailleurs, pour l'espèce qui nous intéresse, on ne remarque aucune bande, rien n'a été amplifié, il n'y a donc à priori pas présence de *V. harveyi* ou *V. tapetis* sur les thalles de *Sargassum muticum* à la période de prélèvement tout du moins. Ce qui pourrait signifier que *S. muticum* produit des composés capables d'inhiber la croissance ou la fixation de ces bactéries sur son thalle. Les souches bactériennes étudiées dans cette étude sont nocives pour l'aquaculture. Ces deux organismes en particulier, peuvent en effet être impliqués dans la vibriose d'un coquillage à haute valeur marchande : l'ormeau ; cette infection entraine une grande mortalité durant la période estivale en structures aquacoles ainsi qu'en milieu naturel long du littoral normano-breton (France) (Guérin, 2011, 2012). En effet, depuis 1997, l'un d'entre eux, *Vibrio harveyi*, a régulièrement été décrit comme attaquant les exploitations aquacoles françaises et les stocks naturels d'ormeaux européens *Haliotis tuberculat*a, provoquant jusqu'à 80% de mortalité en quelques jours (Nicolas *et al*., 2002).

Des substances permettant d'empêcher ce type d'infections sont donc particulièrement recherchées.

Par ailleurs, il faut préciser que ce protocole est spécifique à la détection de la présence de *V. harveyi* sur les échantillons testés. Un autre protocole plus général est utilisé pour détecter la présence de bactéries du genre *Vibrio,* notamment à l'aide d'amorces amplifiant spécifiquement l'ADN codant pour l'ARNr 16S.

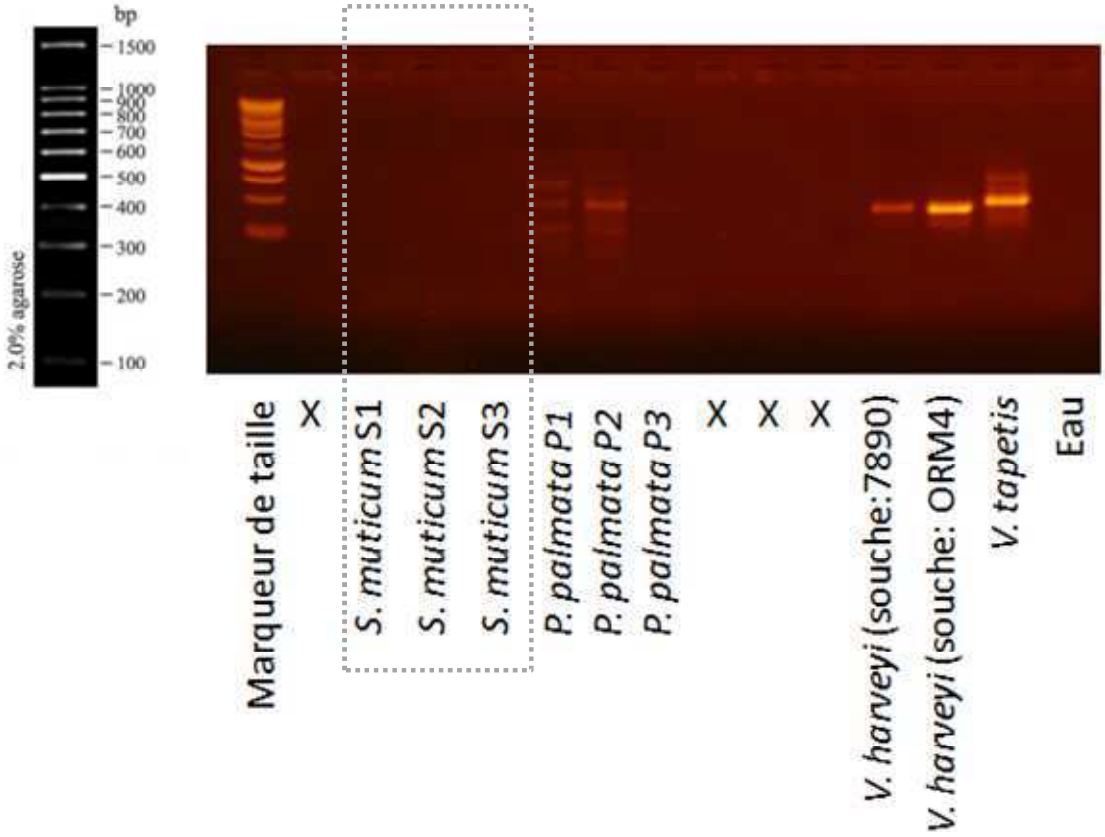


Figure A.5. Photographie du gel obtenu. « X », puits vide ; S1,2 et 3 réplicat des amplification faites sur les échantillons obtenus à partir de *Sargassum muticum* provenant du Dellec. Témoins bactériens *Vibrio harveyi* (souche 7890 et ORM4) et *Vibrio Tapetis* et témoin négatif noté : Eau.

Conclusion

Les résultats présentés dans cet encadré viennent compléter l'étude effectuée au paragraphe IV.3 *Sargassum muticum* semble produire des composés actifs contre de nombreuses bactéries. Les algues provenant des côtes françaises ont déjà montré des activités contre certains pathogènes humains comme *Pseudomonas aeruginosa*. Cette étude complémentaire permet de faire l'hypothèse que des composés actifs contre *Vibrio harveyi* et *V. tapetis* sont synthétisés par *Sargassum muticum* provenant des côtes bretonnes. Cette hypothèse devra être vérifiée en testant l'effet d'extraits de *S. muticum* des côtes bretonnes sur la croissance de ces deux bactéries marines. Les algues françaises seraient donc également actives contre certains pathogènes infectant les organismes marins.

Annexe 5. Système de contrôle des marées en bacs de culture

Sont présentés dans l'annexe suivante : les schémas des bacs de culture avant et après modification, le principe du nouveau système de maintien de la biomasse (système mimétique des marées) ainsi que les plans des nouveaux bacs mis en place. Le schéma de l'armoire électrique n'est pas présenté dans ce manuscrit.

1) Schémas des systèmes existants et à mettre en place

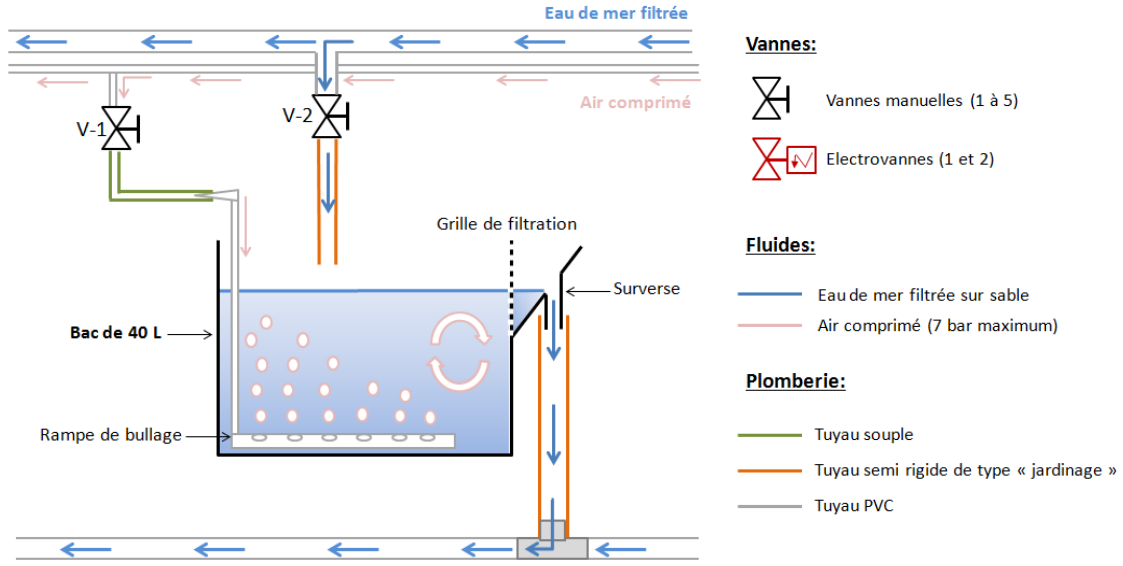


Figure A.6. Schéma simplifié du système existant au laboratoire pour le maintient de biomasse algale.

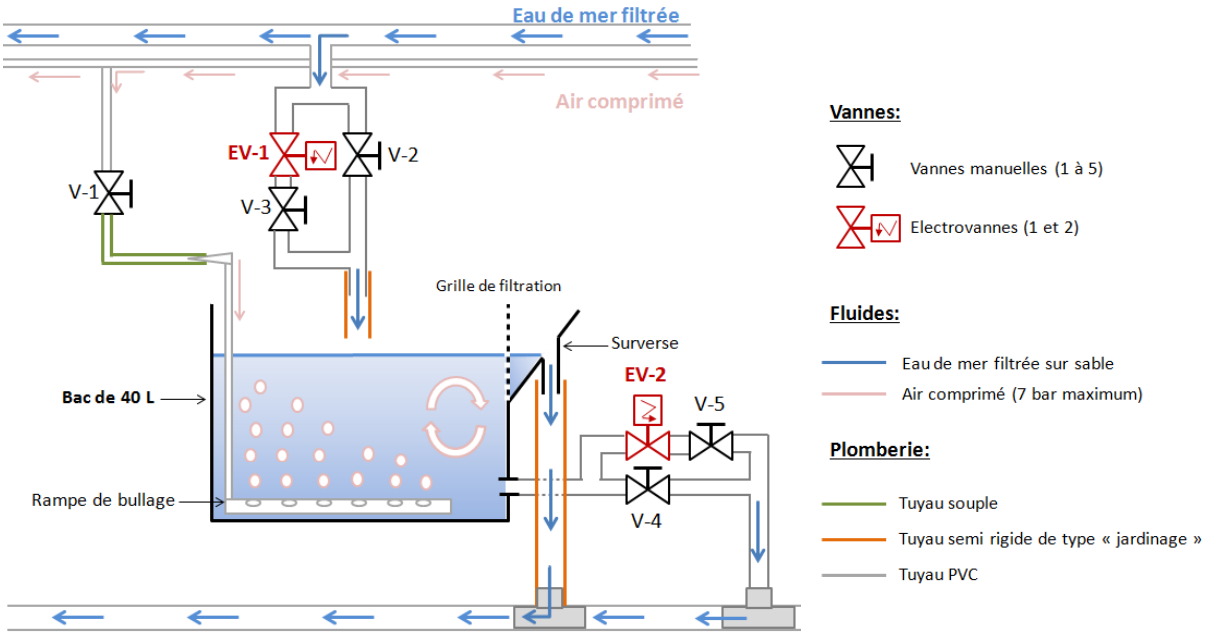


Figure A.7. Schéma simplifié du système à installer prochainement au laboratoire pour l'étude de l'effet des paramètres environnementaux sur la biomasse algale en milieu contrôlé.

2) Fonctionnement du système à mettre en place :

La Figure A.7 présente le nouveau système à installer. Les électrovannes montées sur ce système seront contrôlées par l'armoire électrique commandée et permettront d'effectuer le cycle suivant :

Etat initial :

-Electrovanne d'entrée fermée (EV-1 fermée)- débit vanne manuelle 1 réglé

-Electrovanne de sortie fermée (EV-2 fermée)-débit vanne manuelle 2 réglé

1er état : l'électrovanne d'entrée s'ouvre et reste ouverte durant 6 heures ;

2ème état : au bout des 6 heures, l'électrovanne d'entrée se referme et s'enclenche un temps de temporisation de ¼ d'heure durant lequel plus rien ne se passe ;

3ème état : au bout de la temporisation de ¼ d'heure, l'électrovanne de sortie s'ouvre et reste ouverte durant 6 heures ;

4ème état : au bout des ces 6 heures, l'électrovanne de sortie se referme et s'enclenche une temporisation de ¼ d'heure durant lequel rien ne se passe ;

5ème état : au bout de ¼ d'heure retours à l'état 1.

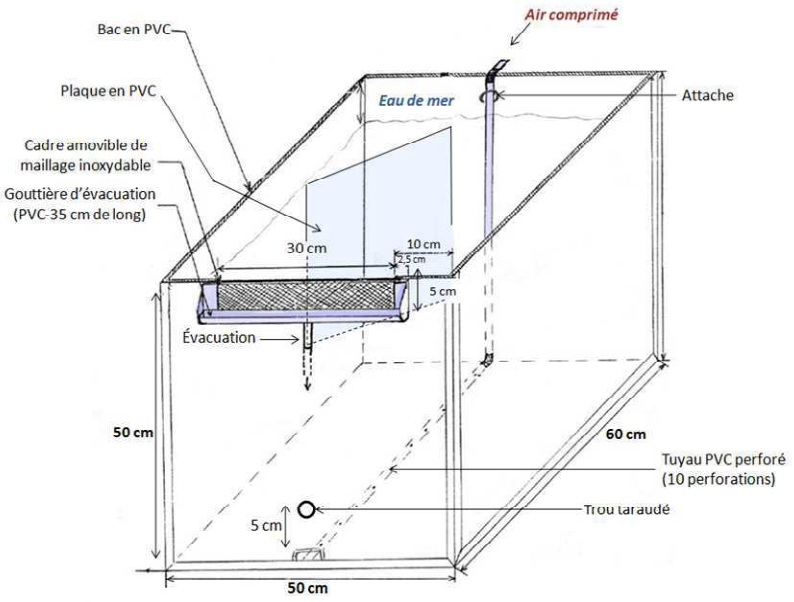
NB : Sécurité

- à tout moment, il est possible de tout arrêter (coup de point) grâce au bouton d'arrêt d'urgence. Toutes les électrovannes se referment. Il est alors possible d'agir manuellement sur les bacs grâce aux vannes manuelles.

- en cas de surchauffe, un ventilateur situé dans l'enceinte de l'armoire s'enclenche suivant la consigne de température fixée.

- les vannes manuelles permettent de gérer indépendamment chacun des bacs (remplissage et vidange).

3) Plan des bacs de culture



NB: concernant la construction nous avons pris quelques précautions :

- La plaque en PVC dans l'angle de chaque bac sert à délimiter un petit compartiment dans l'angle pouvant servir à protéger une résistance d'aquarium.;

- Le tuyau attaché au fond (bullage) doit être amovible pour le nettoyage ;

- Le trou taraudé en bas du bac doit être adapté pour mise en place de raccords *Gardena©* pouvant supporter une électrovanne en sortie ;

- L'évacuation (Ø 2 cm) située en sortie de gouttière doit pouvoir supporter une électrovanne.

Figure A.8. Schéma simplifié des neufs bacs neufs commandés pour le nouveau système de culture au laboratoire (Dessin modifié d'après Erwan Ar Gall).

Tanniou, 2014. Etude de la production de biomolécules d'intérêt (phlorotannins, pigments, lipides) d'algues brunes modèles par des approches combinées de profilage métabolique et d'écophysiologie.

Notre étude s'inscrit dans un processus de recherche de nouveaux composés d'origine naturelle à activités biologiques avérées à partir de macroalgues brunes, avec d'éventuelles perspectives d'exploitation industrielle. **Ainsi, dans un premier volet** nous avons testé des méthodologies innovantes en matière d'extraction en utilisant trois espèces d'algues brunes comme modèles. Nous avons optimisé le protocole d'extraction solide/liquide en estimant divers paramètres cruciaux qui influent sur le rendement d'extraction et sur les activités antiradicalaires des composés extraits. Soucieux de trouver une méthodologie innovante d'extraction plus « verte » répondant aux normes européennes, nous avons donc testé des méthodes d'extraction utilisant des solvants dans leur état supercritique ou sous forme pressurisés. La comparaison avec le procédé d'extraction solide/liquide nous a permis de sélectionner l'extraction par fluides pressurisés (PLE) employée avec un mélange Ethanol-Eau pour l'extraction de composés antiradicalaires avec une haute efficacité. **Dans une deuxième partie** nous nous sommes intéressés aux variations quantitatives et qualitatives des principales macromolécules présentes chez l'espèce invasive *Sargassum muticum* en Europe. L'emploi de deux techniques analytiques, RMN HR-MAS et spectroscopie IR, nous a permis d'avoir une vue d'ensemble des compartiments susceptibles de subir des variations selon la position géographique d'une même espèce à large répartition. Cette étude nous a montré comment une espèce est capable de changer sa composition biochimique en fonction de son environnement et ainsi s'acclimater à des milieux assez différents. Ce travail a mis en évidence les effets de différents paramètres environnementaux sur les compartiments lipidique (analysés en GC), protéique ainsi que sur les quantités de carbohydrates et de pigments (analysés en HPLC). L'influence de ces paramètres sur la taille des individus de *Sargassum muticum* a également été discutée. **La dernière partie de cette étude** nous a permis de décrire les variations quantitatives et qualitatives des phlorotannins chez l'espèce invasive *Sargassum muticum* sur une grande échelle spatiale, le long d'un gradient latitudinal (Norvège-Portugal). Dans un premier temps cette variabilité a été appréhendée grâce à un suivi temporel et spatial des teneurs en phlorotannins. L'étude des variabilités intra-spécifiques et intra-individuelles nous a permis de mettre en évidence un effet du stade de développement et de la partie de l'algue considérée : les teneurs et activités des phlorotannins sont plus importantes dans les crampons et chez les individus matures. Après la recherche d'un protocole simple pour la semi-purification des composés phénoliques présent chez *Sargassum muticum*, nous avons pu mettre en évidence la présence de composés de type phlorethol au moyen de techniques de RMN à deux dimensions (2D). Ces fractions semi-purifiées possèdent des activités antiradicalaire et antibactérienne notoires. Enfin, l'utilisation de plusieurs techniques de séparation membranaires nous a permis d'estimer le poids moléculaire des différents composés présents dans le pool de composés phénoliques extrait. Enfin, suite aux constats effectués sur les populations, l'effet de l'intensité lumineuse et de la température de l'eau a pu être apprécié isolément : les radiations UVA et UVB boostent la production de CP alors qu'une augmentation de la température fait chuter la production de CP chez *S. muticum.*

Mots clefs : *Sargassum muticum*, composés phénoliques, procédés d'extractions, activités anti-radicalaires et anti-bactériennes gradient latitudinal européen, macromolécules

Tanniou, 2014. Production of interesting biomolecules (phlorotannins, pigments, lipids) in brown algal model, by combined approaches: metabolic profiling and ecophysiology.

Our study is part of the research process for new compounds of natural origin with biological activities and possible industrial perspectives. **In a first part**, we tested innovative extraction methodologies using three brown algae species as model. We optimized the solid/liquid extraction protocol by estimating diverse crucial parameters which influence the extraction yield and radical scavenging activities of extracts. In order to find an innovative and more "green" extraction methodology answering the European standards, we thus tested more recent extraction methods using solvents in their supercritical state or under pressure. The comparison with the solid/liquid process allowed us to select pressurized liquid extraction (PLE) using an ethanol-water mixture for the extraction of active compounds with a high efficiency, but also to select *Sargassum muticum* as an interesting model for further investigations. **In a second part**, we were interested in the quantitative and qualitative variations of the main macromolecules present in the invasive species *S. muticum* in Europe. The employment of two analytical techniques (NMR HR-MAS and IR spectroscopy), allowed us to have an overview of biochemical parts of the algae, which vary according to the geographical position of this wide spread species. This study showed how a species is able to modify its biochemical composition, and then to acclimate, according to the environment. We then focused on molecules, which showed important variations along the latitudinal range of *S. muticum*. This work highlighted the effects of environmental parameters on lipid (GC analysis) and protein compartments as well as on carbohydrates and pigments quantities (HPLC analysis). The influence of these parameters on the size of individuals was also discussed. **The last part of this study** allowed us to describe the quantitative and qualitative variations of phlorotannins in *S. muticum* on a large spatial scale, along a latitudinal gradient (Norway-Portugal). At first this variability was measured thanks to temporal and spatial follow-up of the phlorotannins contents. The study of intra-specific and intra-individual variabilities allowed us to highlight an effect of the development stage and of the seaweed part: phlorotannins contents and activities are more important in holdfast and in mature individuals. After the research of a simple protocol for the phenolic compounds semi-purification present in *Sargassum muticum*, we were able to highlight the presence of compounds of only phlorethol type in this species by means of 2D RMN techniques. These semi-purified fractions possess notorious radical scavenging and antibacterial activities. Finally, the use of several membrane separation techniques allowed us to consider the molecular weight of the various compounds present in the extracted pool of phenolic compounds. Finally, under controlled conditions, the effects of the light quality and the seawater temperature were tested: UV-A and UV-B radiations boost the production of CP while an increase of the temperature makes the phlorotannins production decreasing in *S. muticum*.

Keywords: *Sargassum muticum*, phenolic compounds, extraction processes, radical scavenging and anti-bacterial activities, European latitudinal gradient, macromolecules