

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

---

ÉCOLE DOCTORALE VENAM

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Étude du polymorphisme pigmentaire de l'algue rouge  
*Grateloupia turuturu* au travers de la purification et la  
caractérisation de la R-Phycoérythrine en vue d'une  
valorisation industrielle.

---

THÈSE DE DOCTORAT  
Discipline : Biologie des organismes  
Spécialité : Biochimie marine

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Mathilde MUNIER**

*Le 10 décembre 2013, devant le jury ci-dessous*

Rapporteurs Nathalie BOURGOUGNON, Professeur, Université de Bretagne Sud (LBCM)  
Claire HELLIO, PhD-HDR Reader eq. Professeur, Université de Portsmouth  
Examineurs Anne-Marie RUSIG, Maitre de Conférences, Université de Caen Basse-Normandie  
(FEME)  
Erwan AR GALL, Maitre de Conférences (HDR), Université de Brest (IUEM, Lémarr)  
Michèle MORANCAIS, Maitre de Conférences, Université de Nantes (MMS)  
Joël FLEURENCE, Professeur, Université de Nantes (MMS)  
Membre invité Justine DUMAY, Maitre de Conférences, Université de Nantes (MMS)

*Directeurs de thèse :*

Joël FLEURENCE, Professeur, Université de Nantes (MMS)  
Pascal JAOUEN, Professeur, Université de Nantes (GEPEA)





## **Remerciements**

*Ce n'est certainement pas la partie la plus aisée de la rédaction du manuscrit, tant il est difficile de remercier toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail sans en oublier. Je vais tâcher de faire au mieux.*

*En premier lieu je souhaite remercier Joël Fleurence, Professeur à l'Université de Nantes, de m'avoir acceptée en stage de Master 2 au sein du laboratoire MMS et d'avoir voulu poursuivre les expérimentations sur Grateloupia en me proposant un sujet de thèse. Je le remercie pour sa présence, son soutien, ses conseils et les encouragements dont il a fait preuve au cours de ces années d'encadrement.*

*Je souhaite également remercier Pascal Jaouen, Professeur à l'Université de Nantes, d'avoir co-dirigé ce travail. Je le remercie pour ses remarques pertinentes sur mon travail, mais aussi pour la valorisation de ce dernier.*

*Un grand merci à Justine Dumay, Maître de Conférences à l'Université de Nantes, d'avoir accepté d'encadrer ce doctorat. Je la remercie pour sa patience, ses précieux conseils tant en recherche qu'en enseignement, son écoute, son enthousiasme, son ouverture d'esprit et son soutien.*

*Je remercie également Michèle Morançais, Maître de Conférences à l'Université de Nantes, d'avoir accepté d'encadrer ce travail. Je la remercie de m'avoir transmis ses connaissances et ses remarques constructives.*

*Je remercie le Professeur Nathalie Bourgougnon et le Docteur Claire Hellio d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également Anne-Marie Rusig et Erwan Ar Gall d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et également d'être examinateurs de ma thèse.*

*Je tiens à remercier toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.*

*Un grand merci à Françoise Goudard qui a accepté de me former à l'électrophorèse bidimensionnelle, et de m'avoir rappelé Ô combien la biochimie est un domaine de découvertes quotidiennes.*

*Je voudrais remercier tous les occupants du bâtiment ISOMER. Merci à Vincent Turpin pour ses conseils avisés sur les sorties terrain. Merci à Karine Le Ker de m'avoir formé à la SDS-PAGE. Merci aux doctorants avec qui j'ai pu partager quelques moments de détente et de légèreté. Merci à Sébastien pour son aide, avec qui j'ai pu échanger des discussions scientifiques et non scientifiques et pour son amitié. Un grand merci aux « jeunes », Anthony et Cécile, avec qui j'ai pu partager une bonne complicité. Courage à vous ! Je cite : « Comme le coureur de fond, le doctorant doit tenir la distance. Mais à la différence du marathonien, personne n'a tracé pour lui de ligne d'arrivée. Le plus dur dans la thèse, c'est de finir. ». Merci aussi à Astrid et Fanny.*

*Je pense également aux stagiaires, qui ont contribué activement à ce travail. Merci à Alva, Anaïs, Marine, Nina, Julia, Simon et Sandy.*

*J'adresse évidemment un grand merci et une profonde affection à tous mes proches, sans qui j'aurais tenu la distance avec difficulté. Mes parents et mes sœurs chéris qui ont toujours été présents malgré la diversité de nos champs de compétences. Merci pour votre soutien sans faille au quotidien, merci d'avoir supporté mes humeurs au cours de ces trois années. Merci à Alexandre, pour son soutien moral et ses encouragements et sa présence au quotidien. Merci à ma famille élargie, oncles, tantes, cousines et cousins, la nouvelle génération ainsi que l'ancienne...mes chères grands-mères dont l'une d'elles est partie bien trop vite.*

*Un grand merci à Nuria, que j'ai rencontrée grâce à la thèse, pour qui je voue une profonde amitié, et sans qui je n'aurais pu atteindre la ligne d'arrivée. Merci pour ses conseils et remarques, son soutien, son énergie, sa présence et sa générosité. Un grand merci aussi à Francesca pour sa folie douce et sa bonne humeur ; à Kelvin pour la découverte de ses cultures, sa joie de vivre et ses conseils avisés ; à Nizar, ami de longue date, pour sa joie de vivre, sa bonne humeur et ses précieuses remarques ; et puis un merci à tous les autres de Nantes, de Pau, de Marseille et de Paris, de Cartagena et de New York qui se reconnaîtront.*

## *L'homme et la mer*

*Homme libre, toujours tu chériras la mer !  
La mer est ton miroir ; tu contemples ton âme  
Dans le déroulement infini de sa lame,  
Et ton esprit n'est pas un gouffre moins amer.*

*Tu te plais à plonger au sein de ton image ;  
Tu l'embrasses des yeux et des bras, et ton cœur  
Se distrait quelquefois de sa propre rumeur  
Au bruit de cette plainte indomptable et sauvage.*

*Vous êtes tous les deux ténébreux et discrets:  
Homme, nul n'a sondé le fond de tes abîmes ;  
Ô mer, nul ne connaît tes richesses intimes,  
Tant vous êtes jaloux de garder vos secrets !*

*Et cependant voilà des siècles innombrables  
Que vous vous combattez sans pitié ni remord,  
Tellement vous aimez le carnage et la mort,  
Ô lutteurs éternels, ô frères implacables !*

*Charles Baudelaire*



## Avant-propos

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire Mer Molécules Santé (MMS) dirigé par le Professeur Yves-François Pouchus et codirigé par le Professeur Joël Fleurence ; et principalement au sein de l'équipe Génie enzymatique, protéines, pigments et photoprotection dirigée par le Professeur Joël Fleurence.

Cette thèse a été financée par une allocation de recherche attribuée à la Fédération de recherche « Pôle Mer et Littoral » (PML) récemment rebaptisée « Institut Universitaire Mer Littoral » (IUML FR-CNRS 3473) et dirigé par le Professeur Pascal Jaouen.

## Publications

### Articles :

2013 : "Variation in the biochemical composition of the edible seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada harvested from two sampling sites on the Brittany coast (France). Influence of storage method on the extraction of the seaweed pigment R-phycoerythrin." Mathilde Munier, Justine Dumay, Michèle Morançais, Pascal Jaouen, et Joël Fleurence. *eJournal of Chemistry*. Reçu le 16 Novembre 2012; Révisé le 4 Janvier 2013; Accepté le 21 Janvier 2013. Editeur académique: Gerald Culioli (**Annexe 1**)

2013: "Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-Phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-Phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*." Mathilde Munier, Sébastien Jubeau, Alva Wijaya, Michèle Morançais, Justine Dumay, Luc Marchal, Pascal Jaouen, et Joël Fleurence. *Food Chemistry*. Soumis le 15 Avril 2013. (**Annexe 2**)

2012 : "What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?" Fleurence J., Morançais M., Dumay J., Decottignies P., Turpin V., Munier M., Garcia-Bueno N., & Jaouen P. (2012). *Trends in Food Science & Technology*, 27Parlement Européen et Conseil du 16 Décembre 2008 , 57-61. (**Annexe 3**)

### Poster :

2013 : "Extraction and purification of R-phycoerythrin pigment from the edible red seaweed *Grateloupia turuturu*". Mathilde Munier, Michèle Morançais, Justine Dumay, Pascal Jaouen, Joël Fleurence. 6<sup>ème</sup> colloque international et rencontres d'affaires : ingrédients cosmétiques et biotechnologies, COSM'ING 2013. CBB-DEVELOPPEMENT. 26-28 JUIN 2013, Saint-Malo. (**Annexe 4**)



# Table des matières

Introduction générale .....	1
Chapitre I : Étude bibliographique .....	5
1. Généralités sur les algues .....	5
2. Caractéristiques biochimiques des macroalgues .....	6
2.1. <i>Les polysaccharides</i> .....	6
2.1.1. Les polysaccharides de réserves .....	6
2.1.2. Les polysaccharides pariétaux .....	7
2.1.2.1. Les polysaccharides matriciels des algues rouges .....	8
2.1.2.2. Rôles biologiques des polysaccharides extracellulaires .....	9
2.2. <i>Les lipides algaux</i> .....	10
2.3. <i>Les protéines algales</i> .....	10
2.4. <i>Les pigments algaux</i> .....	11
2.4.1. Les chlorophylles .....	12
2.4.2. Les caroténoïdes .....	13
2.4.3. Les phycobiliprotéines .....	14
2.4.3.1. Le phycobilisome .....	15
2.4.3.2. Structure des chromophores .....	19
2.4.3.3. Les différentes phycobiliprotéines .....	19
L'allophycocyanine .....	20
La phycocyanine .....	21
La phycoérythrocyanine .....	21
La phycoérythrine .....	22
2.4.4. Stratégies d'extraction et de purification de la phycoérythrine .....	23
2.4.4.1. Méthodes d'extraction .....	24
2.4.4.2. Méthodes de purification .....	25
3. Applications des macroalgues et molécules d'intérêt économique .....	28
3.1. <i>Utilisation des algues en tant que légumes, condiments ou ingrédients pour l'alimentation humaine</i> .....	32
3.2. <i>Les molécules d'intérêt issues des algues</i> .....	35
3.2.1. Les phycocolloïdes .....	35
3.2.1.1. Les applications industrielles .....	35
3.2.1.1.1. Alimentaire .....	35
3.2.1.1.2. Cosmétique .....	36
3.2.1.1.3. Autres applications .....	37

3.2.1.2.	La santé humaine .....	37
3.2.2.	Les lipides .....	38
3.2.3.	Les pigments algaux .....	38
3.2.3.1.	Chlorophylles .....	39
3.2.3.2.	Caroténoïdes .....	39
3.2.3.3.	Phycobiliprotéines .....	41
3.2.3.3.1.	Colorant.....	41
3.2.3.3.2.	Marqueur fluorescent .....	42
3.2.3.3.3.	Bioactivité .....	42
3.3.	<i>Autres utilisations des macroalgues</i> .....	43
3.3.1.	Utilisation des algues en tant fertilisants pour l'agriculture.....	43
3.3.2.	Utilisation des algues pour l'alimentation animale.....	43
3.3.3.	Autres actifs algaux utilisés en cosmétique : .....	44
4.	Présentation du modèle d'étude <i>Grateloupia turuturu</i> .....	45
4.1.	<i>Systématique et description</i> .....	45
4.1.1.	Systématique .....	45
4.1.2.	Description .....	47
4.2.	<i>Ecologie et reproduction</i> .....	47
4.3.	<i>Caractérisation biochimique</i> .....	49
4.4.	<i>Valorisation de Grateloupia turuturu</i> .....	51
5.	Rôles des paramètres environnementaux sur la biologie et la distribution des algues .....	52
5.1.	<i>La lumière</i> .....	53
5.2.	<i>La température</i> .....	55
5.3.	<i>La salinité</i> .....	55
5.4.	<i>La durée d'émersion</i> .....	56
5.5.	<i>L'hydrodynamisme</i> .....	57
5.6.	<i>La nature du substrat</i> .....	58
<b><u>Chapitre II : Matériels et Méthodes</u></b> .....		<b>59</b>
1.	Matériel biologique.....	59
1.1.	<i>Grateloupia turuturu</i> .....	59
1.2.	<i>Porphyridium cruentum</i> .....	59
2.	Méthodologie d'extraction et de pré-purification .....	60
2.1.	<i>Extraction des composants hydrosolubles</i> .....	60
2.2.	<i>Pré-purification au sulfate d'ammonium</i> .....	61



3.	Matériel et procédures analytiques .....	62
3.1.	<i>Spectrophotométrie</i> .....	62
3.2.	<i>Fluorimétrie</i> .....	64
3.3.	<i>Chromatographie</i> .....	65
3.3.1.	Chromatographie de gel filtration .....	65
3.3.2.	Chromatographie d'échange d'anions .....	67
3.4.	<i>Electrophorèse en conditions dénaturantes : SDS-PAGE</i> .....	68
4.	Caractérisation biochimique.....	72
4.1.	<i>La matière sèche</i> .....	72
4.2.	<i>Les cendres</i> .....	72
4.3.	<i>Les protéines totales</i> .....	72
4.4.	<i>Les protéines hydrosolubles</i> .....	74
4.5.	<i>La concentration en R-PE et indices de pureté</i> .....	75
4.6.	<i>La concentration en B-PE</i> .....	76
4.7.	<i>Les sucres hydrosolubles</i> .....	77
4.8.	<i>Les lipides</i> .....	78
5.	Observation microscopique et détermination de l'épaisseur des thalles .....	80
6.	Statistiques et expression des résultats.....	81

Chapitre III : Variation de la composition biochimique de *Grateloupia turuturu* prélevée sur deux sites d'échantillonnage : Influence de la méthode de stockage sur l'extraction de la R-PE..... 83

1.	Contexte de l'étude .....	83
2.	Étude de 2010 .....	84
2.1.	<i>Protocole de l'étude</i> .....	84
2.2.	<i>Résultats et discussion</i> .....	86
2.2.1.	Comparaison des sites d'échantillonnage .....	86
2.2.2.	Comparaison des méthodes de stockage.....	92
3.	Étude de 2013 .....	93
3.1.	<i>Protocole de l'étude</i> .....	93
3.1.1.	Caractérisation des sites de prélèvement.....	93
3.1.2.	Caractéristiques morphologiques de <i>Grateloupia turuturu</i> .....	93
3.1.3.	Caractéristiques biochimiques de <i>Grateloupia turuturu</i> .....	94
3.2.	<i>Résultats et discussion</i> .....	94

3.2.1.	Caractérisation des sites de prélèvement.....	94
3.2.1.	Caractéristiques morphologiques de <i>Grateloupia turuturu</i> .....	98
3.2.1.	Caractéristiques biochimiques de <i>Grateloupia turuturu</i> .....	99
4.	Conclusion .....	101

Chapitre IV : Influence des paramètres physicochimiques (température, lumière, pH) sur la stabilité de la R-PE de *Grateloupia turuturu* et de la B-PE de *Porphyridium cruentum*..... 105

1.	Contexte de l'étude.....	105
2.	Protocole de l'étude .....	105
2.1.	<i>Stabilité à la lumière</i> .....	106
2.2.	<i>Stabilité au pH</i> .....	106
2.3.	<i>Stabilité à la température</i> .....	106
3.	Résultats et discussion de l'étude.....	107
3.1.	<i>Stabilité à la lumière</i> .....	107
3.2.	<i>Stabilité au pH</i> .....	109
3.3.	<i>Stabilité à la température</i> .....	113
3.4.	<i>Stabilité en fonction de la température et de la durée de stockage</i> .....	114
4.	Conclusion .....	116

Chapitre V : Mise au point d'un protocole de purification de la R-PE de *Grateloupia turuturu*. Etude physicochimique des différentes fractions..... 119

1.	Contexte de l'étude.....	119
2.	Protocole de purification .....	119
2.1.	<i>Optimisation des conditions d'extraction</i> .....	119
2.1.1.	Quel ratio masse de poudre algale/volume de tampon d'extraction est le plus pertinent ? .....	120
2.1.2.	Le nombre d'extraction a-t-il un impact sur les rendements d'extraction en R-PE et sur l'IP? .....	121
2.2.	<i>Purification de la R-PE de <i>Grateloupia turuturu</i></i> .....	123
2.2.1.	Purification partielle par précipitation au sulfate d'ammonium .....	123
2.2.2.	Purification par chromatographie de gel filtration.....	125
2.2.3.	Purification par chromatographie échangeuse d'anions semi-préparative 127	
2.2.3.1.	Gradient linéaire.....	128

2.2.3.2. Gradient par paliers .....	129
2.3. Caractérisation de l'extrait brut et des fractions.....	132
2.4. Autres composés d'intérêt .....	138
3. Conclusion .....	140
<u>Chapitre VI : Influence de protectants et conservateurs alimentaires sur la</u>	
<u>stabilité de la R-PE de <i>Grateloupia turuturu</i> .....</u>	<u>143</u>
1. Contexte de l'étude.....	143
2. Etude de l'utilisation de protectants sur l'extraction de la R-PE de <i>Grateloupia</i>	
<i>turuturu</i> .....	143
2.1. Protocole de l'étude.....	144
2.2. Résultats et discussion de l'étude .....	145
2.2.1. Protectants seuls.....	145
2.2.2. Protectants en mélange .....	147
3. Etude de l'effet de conservateurs alimentaires sur la stabilité de la R-PE	
extraite de <i>Grateloupia turuturu</i> dans le temps et à différentes températures de	
stockage.....	150
3.1. Protocole de l'étude.....	150
3.2. Résultats et discussion.....	151
3.2.1. Stockage à température ambiante .....	151
3.2.2. Stockage à 4°C .....	152
3.2.3. Stockage à -20°C .....	154
3.2.4. Analyse par chromatographie de gel filtration.....	156
3.2.1. Analyse colorimétrique .....	160
4. Conclusion .....	161
<u>Conclusion générale .....</u>	<u>163</u>
<u>Glossaire.....</u>	<u>189</u>



# Abréviations

A : absorbance

APC(s) : allophycocyanine(s)

APS: persulfate d'ammonium

B-PE : B-Phycoérythrine

BSA : Bovin Serum Albumin (anglais)

CSHPF: Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France

Da : dalton

DEAE: diéthylaminoéthylammonium

dw : dry weight

EDTA : acide tétra-acétique diaminoéthylène

EI : chromatographie échange d'ions

fw : fresh weight

GF : chromatographie de gel filtration

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

IP : indice de pureté

kDa : kiloDalton

MAAs : acides aminés de type mycosporine

MF : matière fraîche

MS : matière sèche

PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

PAI : produit alimentaire intermédiaire

PBP(s) : Phycobiliprotéine(s)

PC(s) : Phycocyanine(s)

PEB(s) : Phycoerythrobiline(s)

PEC : Phycoérythrocyanine

pI: point isoélectrique

PS: poids sec

PUB(s) : Phycourobiline(s)

PXB(s) : Phycobilivioline(s)

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

ROS: Reactive Oxygen Species (Anglais) = Espèces Réactives Oxygénées (Français)

R-PE : R-phycoérythrine

R-PC : R-phycocyanine

SAB: serum albumine bovine

sat : saturation

SDS : sodium dodecylsulfate

SNK : Student-Newman-Keuls multiple comparison test

TEMED : N,N,N',N'-tetramethyle-éthylènediamine

TTI: time temperature integrator (anglais)

UF : ultrafiltration

# Liste des figures

Figure 1: structure chimique du floridoside et de l'isofloridoside .....	7
Figure 2: structure chimique des chlorophylles <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> et <i>d</i> .....	13
Figure 3: cycle des xanthophylles (activé en cas d'excès de lumière) d'après Rowan 1989.	14
Figure 4 : représentation schématique de la membrane des thylakoïdes et des phycobilisomes ; d'après Glazer 1984 .....	16
Figure 5 : voie de transfert de l'énergie lumineuse au sein du phycobilisome.....	16
Figure 6 : schéma de la structure du phycobilisome d'après Glazer 1982 .....	18
Figure 7 : représentation schématique de l'assemblage de trimères et hexamères de phycobiliprotéines à partir des sous-unités $\alpha$ et $\beta$ d'après Ke 2001 .....	18
Figure 8 : structure chimique des différents chromophores d'après Glazer 1988a .....	19
Figure 10: structure de l'allophycocyanine.....	20
Figure 11 : structure de la C-phycocyanine .....	21
Figure 12 : structure de la R-phycocyanine .....	21
Figure 9 : structure de la phycoérythrocyanine .....	21
Figure 13 : structure de la .....	22
Figure 14 : structure de la .....	22
Figure 15 : structure de la .....	23
Figure 16 : structure de la C-phycoérythrine.....	23
Figure 17 : répartition de la consommation mondiale d'algue entre les principaux pays (Breizh'alg 2012) .....	29
Figure 18 : production halieutique mondiale en milliers de tonnes de plantes aquatiques par capture et aquaculture de 1950 à 2011 (FAO 2013) .....	30
Figure 19 : production mondiale d'algues par aquaculture (tonnes eq. frais) de 1950 à 2011 (FAO 2013) .....	31
Figure 20 : exemples de produits alimentaires à base d'algues (Google images) .....	34
Figure 21 : spécimen de <i>Grateloupia turuturu</i> Yamada. ....	45
Figure 22 : distribution de <i>Grateloupia turuturu</i> par pays (Guiry 2013) .....	46
Figure 23 : cycle de reproduction de <i>Grateloupia turuturu</i> (Simon-Colin 2001) .....	48
Figure 24: acides aminés non protéiques, uréido-aminoacides, et bêtaïnes des Cryptonémiales (= Halyméniales) (Kornprobst 2005) .....	50
Figure 25 : produit alimentaire à base de <i>Grateloupia spp</i> commercialisé sous le nom de Qingzheng et disponible sur internet (Weihai Qingzheng Foods Co) .....	51
Figure 26 : évolution du pourcentage d'éclaircissement en fonction de la profondeur, d'après Gayral et Cosson 1986.....	53
Figure 27 : étapes de conditionnement des algues après prélèvements .....	59
Figure 28 : observation microscopique d'une culture de <i>Porphyridium cruentum</i> (Jubeau 2012).....	60
Figure 29: étapes du procédé d'extraction des composants hydrosolubles .....	61

Figure 30 : étapes de précipitation d'un extrait brut de R-PE au sulfate d'ammonium (85%)	62
Figure 31: spectre électromagnétique .....	63
Figure 32: spectre de fluorescence de la R-Phycoérythrine de <i>Grateloupia turuturu</i> .....	64
Figure 33 : composition de la chaine de chromatographie .....	65
Figure 34 : représentation schématique du principe de la chromatographie de gel filtration (Leblanc 2013) .....	66
Figure 35 : colonne de chromatographie de gel filtration Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences).....	66
Figure 36 : droite de calibration de la colonne de chromatographie de gel filtration (Superdex 200 HR 10/30).....	67
Figure 37: appareillage pour gels d'électrophorèse (Mini-Protean II, Bio-Rad).....	70
Figure 38 : profil électrophorétique du marqueur de taille (MW).....	71
Figure 39 : courbe étalon pour la détermination de la taille des profils électrophorétiques ...	72
Figure 40 : étape de minéralisation .....	73
Figure 41 : étape de distillation.....	73
Figure 42 : gamme étalon du dosage des protéines hydrosolubles par la méthode de Bradford .....	74
Figure 43 : spectre d'absorbance caractéristique de la R-PE de <i>Grateloupia turuturu</i> .....	75
Figure 44 : spectres d'absorbance et de fluorescence caractéristiques de la B-PE de <i>Porphyridium cruentum</i> .....	77
Figure 45 : gamme étalon du dosage des sucres hydrosolubles par la méthode de Dubois.	78
Figure 46: filtration du macérât d'algue sur Buchner .....	79
Figure 47 : obtention de la phase liposoluble par décantation .....	79
Figure 48 : phase liposoluble avant et après évaporation des solvants .....	80
Figure 49 : hachis entre lames et lamelles d'algues fraîches.....	80
Figure 50: microscope optique et système d'acquisition utilisés pour la détermination de l'épaisseur des thalles .....	81
Figure 51 : localisation des deux sites de prélèvement de <i>Grateloupia turuturu</i> le long de la côte Atlantique (France).....	84
Figure 52 : protocole d'échantillonnage et de la méthode de stockage. ....	85
Figure 53 : thalles de <i>Grateloupia turuturu</i> collectés à partir des deux sites d'échantillonnage A et B. (a) Observation morphologique d'un thalle issu du site A. (b) Observation morphologique d'un thalle issu du site B. (c) Coupe transversale d'un thalle issu du site A. (d) Coupe transversale d'un thalle issu du site B.....	86
Figure 54 : spectres d'absorbance des EB et des EP de R-PE de <i>G. turuturu</i> . Comparaison des méthodes de stockage pour les trois échantillons. (a) aucun stockage ; (b) stockage pendant six mois à température ambiante à l'obscurité ; (c) stockage pendant six mois à -20°C à l'obscurité (3), des deux sites de prélèvement A (rose) et B (bleu).....	91
Figure 55 : durée d'ensoleillement aux printemps 2010 et 2013 de la zone d'étude par rapport à la moyenne de référence (1991-2010) (Archives Météo France).....	96
Figure 56 : comparaison de la biomasse disponible aux mois de Mai 2010 et 2013 au niveau du site B (même zone photographiée).....	97



Figure 57 : thalles de <i>Grateloupia turuturu</i> prélevés sur les deux sites (à gauche : site A, à droite : site B).....	98
Figure 58 : effet de la durée d'exposition à la lumière (0 à 48 heures) sur les spectres d'absorbance et de fluorescence de la R-PE et de la B-PE.....	107
Figure 59 : valeurs d'absorbance et de fluorescence maximales de la R-PE et de la B-PE en fonction de la durée d'exposition à la lumière ; la zone de stabilité est identifiée par la zone grisée .....	108
Figure 60 : effets du pH sur les spectres d'absorption de la R-PE et de la B-PE.....	110
Figure 61 : effets du pH sur les spectres d'émission de fluorescence de la R-PE et de la B-PE excitées à 498 nm. Le maximum d'émission de fluorescence est de 575 nm .....	111
Figure 62 : valeurs d'absorbance et de fluorescence maximales de la R-PE et de la B-PE en fonction du pH ; la zone de stabilité est identifiée par la zone grisée.....	112
Figure 63 : effets de la température (4, 20, 40, 60 et 100°C) sur les spectres d'absorption et de fluorescence de la R-PE et de la B-PE.....	113
Figure 64 : valeurs d'absorbance et de fluorescence maximales de la R-PE et de la B-PE en fonction de la température ; la zone de stabilité est identifiée par la zone grisée .....	114
Figure 65 : effets de la durée de stockage (0h, 6h, 24h, 48h, 1 semaine et 2 semaines) à 4°C et -20°C sur les spectres d'absorption et de fluorescence de la R-PE et de la B-PE ..	115
Figure 66 : valeurs d'absorbance et de fluorescence maximales de la R-PE et de la B-PE en fonction de la durée du stockage à -20°C et à 4°C.....	115
Figure 67 : spectres des surnageants de la 1 <sup>ère</sup> étape (n = 1 en rose), de la 4 <sup>ème</sup> étape (n = 4 en turquoise) et de la 6 <sup>ème</sup> étape (n = 6 en vert) .....	121
Figure 68: rendement en R-PE et IP moyens des différents surnageants obtenus par extraction multiple .....	122
Figure 69 : culots (tubes de gauche) (C) et surnageants (tubes de droite) (S) obtenus après précipitation au sulfate d'ammonium à différents pourcentages de saturation.....	124
Figure 70 : chromatogramme de gel filtration analytique de l'extrait brut à 280 nm (orange) et 565 nm (bleu). (a) spectre d'absorbance du pic 2 ; (b) spectre d'absorbance du pic 4 .....	126
Figure 71 : chromatogrammes d'échange d'anions de l'extrait brut élué avec un gradient linéaire. A : 0 à 250 mM en 30 min ; B : 0 à 400 mM en 30 min ; C : 0 à 500 mM en 30 min .....	128
Figure 72 : chromatogrammes d'échange d'anions de l'extrait brut élué selon un gradient par paliers. A : 0-200-300-400 mM NaCl ; B : 0-100-200-300 mM NaCl ; C : 0-150-200-1000 mM NaCl .....	129
Figure 73 : représentation schématique du protocole d'extraction et de purification de la R-PE de <i>Grateloupia turuturu</i> par chromatographie d'échange d'anions semi-préparative. ....	131
Figure 74 : spectre d'absorbance (rose) et de fluorescence (vert) de l'extrait brut .....	132
Figure 75 : coloration (A, D et G), spectres d'absorbance (B, E et H) et chromatogrammes de gel filtration (C, F et I) des fractions obtenues après l'étape de purification.....	133
Figure 76 : spectres de fluorescence de l'extrait brut et des fractions obtenues après purification par chromatographie d'échange d'anions. $\lambda_{ex}$ = 498 nm.....	136
Figure 77 : profils électrophorétiques en conditions dénaturantes de l'extrait brut et des fractions obtenues après purification et dialyse et révélés par fluorescence.....	137

Figure 78 : profils électrophorétiques en conditions dénaturantes de l'extrait brut et des fractions obtenues après purification et dialyse et révélés au bleu de Coomassie. MW = Marqueurs de taille .....	137
Figure 79 : profils chromatographiques à 330 nm (vert), 280 nm (orange) et 565 nm (turquoise) de l'extrait brut en chromatographie de gel filtration .....	139
Figure 80 : spectres d'absorbance des extraits bruts obtenus avec ou sans protectants ...	145
Figure 81 : chromatogrammes de gel filtration des extraits bruts obtenus par extraction au tampon phosphate seul (A) et additionné de protectant seul : (B) azide de sodium ; (C) EDTA ; (D) 2-mercaptoéthanol .....	146
Figure 82 : spectres d'absorbance et chromatogrammes de gel filtration des extraits bruts obtenus sans protectants (A et B) et avec protectants (C et D) .....	148
Figure 83 : évolution du ratio R pour les 5 conservateurs étudiés et le témoin au cours des 42 jours aux trois températures de stockage étudiées .....	157
Figure 84 : chromatogramme de l'extrait contenant de l'acide ascorbique stocké 35 jours à 4°C .....	158
Figure 85 : chromatogramme de l'échantillon contenant de l'acide ascorbique stocké 35 jours à -20°C .....	159
Figure 86 : évolution de la coloration des échantillons stockés à température ambiante, à 4°C et à -20°C, entre le premier jour et le dernier jour de l'étude. A : témoin ; B : NaCl ; C : MgCl <sub>2</sub> ; D : saccharose ; E : acide ascorbique ; F : acide citrique .....	160

# Liste des tableaux

Tableau I : contenu protéique de quelques algues consommées comme aliments en nutrition humaine (Fleurence 2004) .....	11
Tableau II : techniques de purification de la R-PE de plusieurs espèces d'algues rouges et IP obtenus .....	26
Tableau III : comparaison des prix fournisseurs de différentes phycobiliprotéines. ....	27
Tableau IV : production mondiale en volume des principales espèces d'algues consommées en 2011 (FAO 2013).....	32
Tableau V : algues autorisées à la consommation en France (CEVA 2012).....	33
Tableau VI : propriétés, couleur, origine et utilisations des caroténoïdes .....	40
Tableau VII : composition biochimique de <i>Grateloupia turuturu</i> (Denis <i>et al.</i> 2010).....	49
Tableau VIII : protocole de coloration d'un gel d'électrophorèse .....	70
Tableau IX : aspects morphologiques et composition biochimique d'échantillons de <i>G. turuturu</i> issus des sites de prélèvement des sites A et B.....	87
Tableau X : indices de pureté (IP) et rendement en R-PE des extraits bruts (EB) et des extraits protéiques (EP) des échantillons des sites A et B suivant les trois méthodes de stockage.....	90
Tableau XI : mesures de salinité, de pH, de température de l'eau et de bathymétrie relevées dans les deux sites.....	95
Tableau XII : longueur et largeur moyennes mesurées au niveau des sites A et B. ....	98
Tableau XIII : épaisseurs moyennes, % de cortex et de médulla mesurés pour les thalles prélevés sur les sites A et B .....	99
Tableau XIV : composition biochimique d'échantillons de <i>G. turuturu</i> issus des sites de prélèvement A et B (10/05/2013).....	100
Tableau XV : rendement d'extraction en R-PE et IP moyens obtenus selon différents rapports masse de poudre algale/volume de tampon (nd : non déterminé) .....	120
Tableau XVI : rendements des extractions simple et multiple.....	122
Tableau XVII : IP moyens du surnageant (EB) avant précipitation et des culots (EP : extrait protéique) obtenus par précipitation au sulfate d'ammonium à différents pourcentages. ...	125
Tableau XVIII : pics obtenus d'après le chromatogramme de l'extrait brut en gel filtration à 280 nm et calculs de leur masse moléculaire apparente d'après l'équation de la droite de calibration.....	126
Tableau XIX : indices de pureté, rendements et volume de R-PE et caractérisation biochimique (protéines et sucres hydrosolubles) de l'extrait brut et des fractions obtenues après purification par chromatographie d'échange d'anions.....	134
Tableau XX : concentrations finales des protectants ajoutés au tampon d'extraction.....	144
Tableau XXI : indice de pureté et rendement en R-PE déterminés à partir des spectres d'absorbances des extraits bruts obtenus après extraction au tampon phosphate (pH 7,1 ; 20 mM) avec et sans ajout de protectants seuls.....	146
Tableau XXII : indice de pureté et rendement en R-PE déterminés à partir des spectres d'absorbances des extraits bruts obtenus après extraction au tampon phosphate (pH 7,1 ; 20 mM) avec et sans ajout de protectants en mélange .....	149

Tableau XXIII : évolution de l'intensité de fluorescence des échantillons de R-PE stockés à température ambiante pendant 42 jours, par rapport au témoin au jour 0 (exprimée en %)	151
Tableau XXIV : évolution de la concentration en R-PE des échantillons stockés à température ambiante par rapport au témoin à J0 (exprimée en %)	151
Tableau XXV : évolution de l'intensité de fluorescence de la R-PE des échantillons stockés à 4°C par rapport au témoin à J0 (exprimée en %)	153
Tableau XXVI : évolution de la concentration en R-PE des échantillons stockés à 4°C par rapport au témoin à J0 (exprimée en %)	153
Tableau XXVII : évolution de l'intensité de fluorescence de la R-PE des échantillons stockés à -20°C par rapport au témoin à J0 (exprimée en %)	154
Tableau XXVIII : évolution de la concentration en R-PE des échantillons stockés à -20°C par rapport au témoin à J0 (exprimée en %)	155

## Introduction générale

Les mers et océans du globe, représentant plus de 70% de la surface terrestre, constituent une diversité d'habitats et d'écosystèmes. Ceux-ci se différencient par des facteurs environnementaux évoluant en permanence, tels que la température, la salinité, l'oxygène dissous, le pH, la pression hydrostatique, la présence de polluants et bien d'autres encore. Le milieu marin héberge plus de 270 000 espèces représentant seulement 15% des espèces décrites sur Terre (Ministère de l'écologie du développement durable et de l'énergie 2010). Ces organismes marins constituent un immense réservoir de substances naturelles d'intérêt, par la production de métabolites secondaires impliqués dans divers mécanismes tels que : la défense contre la prédation, le parasitisme et l'infection ; la compétition spatiale et alimentaire ; la communication intra-espèce et l'entretien d'une symbiose mutualiste (Paul et Puglisi 2004; Jirge et Chaudhari 2010). En 2005, Bhakuni et Rawat ont dénombré l'isolement d'environ 16 000 molécules naturelles d'origine marine qui ont fait l'objet d'environ 6 800 publications. Ces molécules, pour la plupart, n'ont pas d'analogue terrestre et certaines possèdent des activités biologiques intéressantes. Pour ces raisons, les molécules d'origine marine suscitent un fort intérêt dans de nombreux secteurs. Pour les domaines de la santé, médecine et pharmacie, ce réservoir constitue une source de principes actifs originaux pour de nombreuses pathologies comme le VIH, les cancers, l'asthme ou les maladies cardiovasculaires (Kijjoa et Sawangwong 2004; Mayer et Hamann 2004). Un bryozoaire originaire du Golfe de Californie a permis l'isolement de la Bryostatine 1 qui permet d'augmenter l'activité des traitements de chimiothérapies. Les conotoxines ont été isolées d'un cône, *Conus magnus*, et ont permis le développement d'un antidouleur, le ziconotide, 50 fois plus puissant que la morphine, commercialisé sous le nom de Prialt (Elan Pharmaceuticals) (Kijjoa et Sawangwong 2004). De même, pour les secteurs de l'agro-alimentaire et de la cosmétique, le milieu marin offre de nombreuses alternatives aux molécules de synthèse utilisées actuellement. Cet environnement, ainsi que les organismes qui le peuplent, doivent être préservés et surveillés et donc étudiés afin de les exploiter au mieux. L'identification de molécules d'intérêt est également motivée par la compréhension de l'écologie des organismes marins. Les algues font partie de cette ressource et sont présentes sur l'ensemble du globe. Elles sont constituées d'organismes très divers, allant du phytoplancton microscopique à des algues pouvant mesurer jusqu'à 100 mètres (*Macrocystis pyrifera*) (Pérez 1997). Elles sont une source importante de molécules d'intérêt puisque 25% des molécules marines identifiées en sont issues (Kijjoa et Sawangwong 2004), et restent à ce jour une ressource disponible en très grande quantité insuffisamment exploitée par rapport aux végétaux terrestres. Leur richesse en protéines (jusqu'à 47% du poids sec) (Fleurence 1999b) font d'elles une source alternative aux protéines végétales

(soja) consommatrices de terres agricoles et surtout d'eau douce (Fleurence *et al.* 2012) dont le problème d'accessibilité est la première cause de mortalité dans le monde (OMS, Boinet 2013). Traditionnellement consommées en Asie du sud-est où elles sont cultivées au Japon depuis le IV<sup>ème</sup> siècle (Mc Hugh 2003), les algues sont encore très discrètes dans les assiettes des consommateurs occidentaux. En France, ce n'est qu'au début des années 90 que certaines algues marines ont été autorisées à la consommation en tant que « légumes » de mer (Fleurence 1991) alors que depuis 40 ans, l'industrie alimentaire tire profit des qualités des algues en tant qu'additifs alimentaires dans la fabrication de diverses préparations culinaires. Pour ces raisons, les algues constituent une biomasse importante pour la recherche et l'identification de métabolites d'intérêt.

L'étude de l'algue rouge *Grateloupia turuturu* et de ses opportunités de valorisation via l'utilisation de la R-Phycoérythrine (R-PE) (pigment photosynthétique rouge) s'inscrit dans cette démarche. Elle s'articule selon deux voies. Cette algue non indigène, originaire du Japon (Gavio et Fredericq 2002), est une espèce proliférante et potentiellement invasive de la côte Atlantique (GIP Bretagne environnement 2010). Ce caractère proliférant est dû à une capacité d'adaptation développée par l'algue mais dont les mécanismes biochimiques sont encore méconnus. Cette faculté adaptative est-elle due à un polymorphisme de la R-PE ? En effet, il a été montré que la structure de ce pigment diffère selon l'organisme dont il est issu et selon les conditions environnementales dans lesquelles se développe l'organisme. On parle d'adaptation chromatique (Bogorad 1975). Ainsi, la masse moléculaire apparente de ce pigment se situe entre 240 et 260 kDa (Sun *et al.* 2009) selon l'organisme étudié. Contrairement aux autres pigments photosynthétiques, les phycoérythrines d'algues rouges possèdent une sous-unité supplémentaire  $\gamma$  permettant d'augmenter la stabilité de la structure du pigment (Glazer et Hixson 1977; Hilditch *et al.* 1991). D'autres sous unités peuvent également être présentes. Par exemple, la R-PE contenue dans l'algue rouge *Gracilaria longa* possède une masse moléculaire apparente de 260 kDa et est caractérisée par la présence d'une sous-unité supplémentaire  $\gamma'$  (D'Agnolo *et al.* 1994). Ainsi sur le plan fondamental, le premier objectif de ce travail vise à accroître les connaissances sur l'espèce non indigène de la façade Atlantique, *Grateloupia turuturu*, au travers de sa composition biochimique et de son pigment photosynthétique, la R-phycoérythrine et de mettre en évidence un éventuel polymorphisme de ce dernier.

Le second objectif de cette étude consiste en la valorisation de cette ressource au travers de l'utilisation de son pigment comme colorant alimentaire. En effet, sa richesse en phycoérythrine et son caractère proliférant confèrent à *Grateloupia turuturu* des potentialités de valorisation. De plus, du fait qu'elle ne soit pas autorisée en alimentation humaine, elle ne se trouve pas en concurrence avec les autres espèces d'algues rouges comme *Palmaria*

*palmata*, *Chondrus crispus*, ou *Porphyra spp.* qui sont actuellement autorisées à la consommation. La R-phycoérythrine constitue également une alternative aux colorants de synthèses soupçonnés de provoquer de nombreux effets néfastes sur la santé humaine (carcinogènes, génotoxiques, neurotoxiques...) (Kobylewski et Jacobson 2010). Il existe plusieurs colorants pour lesquels l'étiquetage des denrées alimentaires doit comporter une mention supplémentaire : peut avoir des effets indésirables sur l'activité et l'attention chez les enfants (Parlement Européen et Conseil du 16 Décembre 2008). La phycoérythrine est un pigment naturel de couleur rose, utilisable en cosmétique et en alimentaire pour ses propriétés de coloration et présentant des effets positifs sur la santé.

Une synthèse bibliographique sur les connaissances des algues et de leur contenu biochimique, sur les diverses voies de valorisation dont elles font l'objet et sur le modèle d'étude *Grateloupia turuturu* est présentée dans le Chapitre I. Les matériels et méthodes ayant servis à l'élaboration de ce travail de thèse sont développés dans le Chapitre II.

Le Chapitre III présente l'étude de l'influence des paramètres environnementaux sur le développement de l'algue et sur sa composition biochimique au travers de la R-PE. Ce présent travail complète celui de Claire Denis (2009) qui avait mis en évidence un effet saisonnier sur le contenu biochimique de cette biomasse et notamment au niveau de la R-PE.

Les résultats de l'étude de la stabilité de la R-phycoérythrine de *Grateloupia turuturu* et de la B-phycoérythrine de *Porphyridium cruentum* à la température, la lumière et au pH sont présentés au Chapitre IV. Ils ont permis d'établir les conditions expérimentales à mettre en œuvre dans un objectif de développement d'un protocole de purification. Sur le plan fondamental, il est nécessaire de purifier le pigment d'intérêt afin de pouvoir le caractériser et de mettre en évidence un éventuel polymorphisme pigmentaire. Ainsi, le Chapitre V présente le protocole de purification de la R-phycoérythrine de *Grateloupia turuturu*. Sur le plan valorisation, il est nécessaire que ce pigment soit stable et c'est ainsi qu'une autre étude a été réalisée afin de tester l'effet de l'ajout de protectants et de conservateurs alimentaires à des extraits bruts de R-PE. Elle est présentée au Chapitre VI.





## Chapitre I : Étude bibliographique

Ce travail a un double objectif : d'une part, présenter le protocole de purification d'un pigment, la R-Phycoérythrine extraite à partir de l'algue rouge *Grateloupia turuturu* afin de caractériser ce pigment et de montrer l'existence d'un éventuel polymorphisme biochimique et d'autre part, promouvoir la valorisation de cette biomasse algale au travers de ce pigment. Après avoir présenté les généralités sur les algues, seront détaillées les potentialités offertes par les Rhodophycées, et plus particulièrement par la macroalgue *Grateloupia turuturu*, et l'influence des paramètres environnementaux sur le développement de la flore marine.

### 1. Généralités sur les algues

Les algues ou *Phycophytes* (du grec *phukos* = algue et *phuton* = plantes) (Boullard 1997) sont des **thallophytes**<sup>1</sup> chlorophylliens. Ce sont des organismes capables de réaliser la photosynthèse et qui sont donc **autotrophes**<sup>2</sup> pour le carbone. Afin d'effectuer la photosynthèse, les algues sont dépendantes de la lumière qui est absorbée par l'eau. Ainsi, l'intensité lumineuse décroît avec la profondeur, devenant alors insuffisante pour assurer une assimilation permettant de compenser les pertes d'énergie dues à la respiration. Cependant, les algues sont limitées à une zone superficielle qui ne dépasse pas 40 à 60 mètres de profondeur (Roland *et al.* 2008). De ce fait, elles sont dotées de pigments dont le rôle physiologique est de capter l'énergie lumineuse. Selon la nature des pigments surnuméraires associés à la chlorophylle, le groupe peut être subdivisé en trois grandes lignées : algues vertes ou Chlorophytes (**plastés**<sup>3</sup> verts), algues brunes ou Chromophytes (plastés jaunes ou bruns) et algues rouges ou Rhodophytes (plastés rouges) (Roland *et al.* 2008). Divers critères écologiques, physiologiques ou biochimiques interviennent dans la phylogénie des algues comme les structures cellulaires (nombre de membranes plastidiales et disposition des **thylakoïdes**<sup>4</sup>, mitochondries, appareil flagellaire), le mode de nutrition, l'habitat ou encore la nature et la localisation des pigments et glucanes de réserve (De Reviens 2003a). Malgré une extrême diversité et une complexité structurale, aussi bien au

---

<sup>1</sup> Végétaux constitués d'un thalle.

<sup>2</sup> Qualifie un organisme capable de synthétiser de la matière organique à partir de la matière minérale, en utilisant, soit l'énergie lumineuse (organisme photoautotrophe, photosynthétique), soit l'énergie chimique (organisme chimioautotrophe).

<sup>3</sup> Organite cellulaire pouvant contenir des pigments (chloroplastes, chromoplastes) ou diverses substances nutritives (amyloplastés).

<sup>4</sup> Système de membranes, indépendantes de la membrane plasmique et portant ou contenant les pigments photosynthétiques des cyanophycées et des plastés. Peut également s'écrire thylacoïde. Voir définitions en fin d'ouvrage dans le glossaire (p.191).

niveau macroscopique que microscopique, les algues peuvent tout de même être classées en une dizaine d'embranchements (De Reviers 2003a).

Le modèle d'étude étant une algue rouge, les caractéristiques biochimiques des macroalgues présentées ci-dessous, se focaliseront plus particulièrement sur cette lignée. Les algues rouges constituent un large groupe d'algues qui sont pour la plupart marines et pluricellulaires, et le plus souvent benthiques. Ainsi, le nombre d'espèces d'algues rouges est estimé à environ 4000 (Kornprobst 2005). Elles sont caractérisées par une composition pigmentaire contenant un seul type de chlorophylle (chlorophylle *a*), des caroténoïdes et des pigments caractéristiques, les phycobiliprotéines.

## **2. Caractéristiques biochimiques des macroalgues**

### **2.1. Les polysaccharides**

Chez les algues, les polysaccharides constituent une part importante de leur composition. Les algues brunes sont les plus riches en glucides (60% en moyenne) tandis que les algues rouges et vertes en contiennent entre 40 et 50% du poids sec (Galland-Irmouli 1999). Il y a peu de glucides simples ou hydrosolubles chez les algues (5 à 10% des glucides totaux) (Galland-Irmouli 1999). Ils sont divisés en deux catégories : les polysaccharides de réserves et les polysaccharides pariétaux. Ces polysaccharides diffèrent selon la taxonomie de l'algue (Chlorophytes, Rhodophytes, Phaeophytes) mais aussi selon l'âge de l'algue, son état physiologique, sa période de récolte où encore selon son environnement (Kloareg et Quatrano 1988). Les polysaccharides algaux peuvent être issus de la paroi cellulaire où ils assurent un rôle de soutien, ou du cytoplasme cellulaire où ils constituent les réserves (Galland-Irmouli 1999).

Il existe aussi une catégorie de polysaccharides de faible masse moléculaire qui a pour rôle de réguler la pression osmotique en passant à travers la membrane. Chez les algues rouges, il existe différents types dont deux sont des isomères : le floridoside et l'isofloridoside (Hellio *et al.* 2004). Chez les algues brunes, il en existe plusieurs dont le plus important est le D-mannitol. Enfin, chez les algues vertes, seules des traces de monosaccharides tels que le fructose et le saccharose sont trouvées.

#### **2.1.1. Les polysaccharides de réserves**

En ce qui concerne les polysaccharides de réserves, les algues brunes synthétisent la laminarine, les algues rouges synthétisent l'amidon floridéen et les algues vertes le glucane et l'amidon (Mabeau *et al.* 1992).

Les algues rouges contiennent de l'amidon floridéen qui présente une structure similaire à l'amidon mais sans amylose. Cependant, il a été montré que certaines espèces d'algues rouges synthétisent tout de même des unités amylose. Une autre différence avec les algues vertes réside dans le fait que cet amidon floridéen est localisé à l'extérieur des plastides (Shimonaga *et al.* 2007). L'amidon est le principal polysaccharide de réserve des algues vertes : il est formé d'amylose (soluble) et d'amylopectine (insoluble) et il est localisé dans les chloroplastes (Viola *et al.* 2001). L'amidon floridéen n'est cependant pas l'unique forme de réserve d'énergie chez les algues rouges. Il existe également deux galactosylglycérols isomères, le floridoside et l'isofloridoside (Goulard *et al.* 2001; Hellio *et al.* 2004; Simon-Colin *et al.* 2004) qui diffèrent seulement au niveau du site de liaison entre le glycérol et l' $\alpha$ -galactose (Figure 1). Selon les espèces, la teneur en floridoside varie entre 2 et 8% mais peut atteindre 22,5% chez *Catenella nipea* (Kirst 1980).

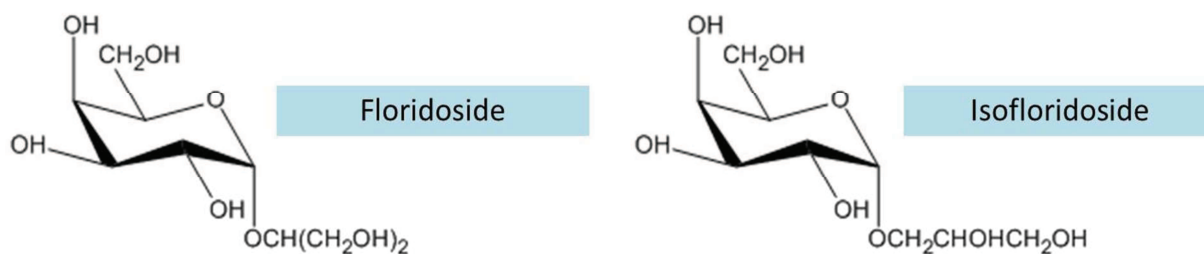


Figure 1: structure chimique du floridoside et de l'isofloridoside

### 2.1.2. Les polysaccharides pariétaux

En ce qui concerne les polysaccharides pariétaux, ils sont dissociés en deux catégories en fonction de la phase pariétale à laquelle ils appartiennent : la phase squelettique, composée de polysaccharides squelettiques (insolubles dans l'eau) et la phase matricielle composée de polysaccharides matriciels (hydrosolubles). Les polysaccharides pariétaux sont des macromolécules non hydrolysables par les enzymes digestives de l'homme, et sont plus communément appelées fibres alimentaires (Bobin-Dubigeon et Lahaye 1996; Lahaye et Kaeffer 1997). Cependant, cette observation est à nuancer puisque une étude publiée dans Nature (Hehemann *et al.* 2010) a montré que la population japonaise possède l'équipement enzymatique (porphyranases, agarases) pour digérer les polysaccharides d'algues.

Les fibres alimentaires peuvent être classées comme étant solubles ou non, sur la base de la formation d'une dispersion quand elles sont mélangées à l'eau (fibres solubles qui ont la capacité de former des gels visqueux dans l'eau) ou non (fibres insolubles) (Jiménez-Escrig et Sanchez-Muniz 2000).

- La plupart des polymères squelettiques sont des polysaccharides neutres, linéaires dont le plus courant est la cellulose. D'autres polymères comme des xylanes et des mannanes, composent aussi cette phase (Kloareg et Quatrano 1988). Le rôle de ces polymères est de structurer la paroi cellulaire et de protéger les cellules. Ces polysaccharides représentent entre 5 et 15% du poids sec (Craigie 1990).

- Les polymères matriciels sont des polysaccharides anioniques sulfatés qui sont difficilement classifiables. Contrairement aux polysaccharides pariétaux, ils peuvent être extraits dans l'eau en présence d'additifs (sels, acides, bases ou chélateurs) (Kloareg et Quatrano 1988). Ils diffèrent selon la lignée. Chez les algues vertes, ce sont des hétéropolysaccharides ramifiés sulfatés, répertoriés en trois groupes : les xyloarabinogalactanes sulfatés issus des algues de l'ordre des *Cladophorales* et des *Codiales*, et les glucuronoxylorhamnanes sulfatés et les glucuronoxylorhamnogalactanes sulfatés, plus communément appelés Ulvanes car ces deux groupes sont issus des *Ulvales* (Robic 2008). Ces ulvanes sont constitués d'unités principales sur la base de résidus de rhamnoses sulfatés liés à des acides uroniques (Jaulneau *et al.* 2010). Les ulvanes représentent 8 à 29% du poids sec (Robic *et al.* 2009).

Chez les algues brunes, trois principaux polysaccharides en sont issus : les fucanes, les ascophyllanes et les alginates qui demeurent les plus connus et majoritaires et qui peuvent représenter 10 à 45% du poids sec (Kloareg et Quatrano 1988).

Enfin, les algues rouges synthétisent deux principaux polysaccharides matriciels aux propriétés gélifiantes et texturantes : les agarocolloïdes et les carraghénanes. Ils sont en général très abondants et représentent en moyenne 30 à 70% du poids sec du **thalle**<sup>5</sup> (Kornprobst 2005).

#### 2.1.2.1. Les polysaccharides matriciels des algues rouges

Les agarocolloïdes et les carraghénanes sont des galactanes sulfatés. Ils sont construits sur la base d'un enchainement linéaire d'unités 3-β-D-galactopyranose et 4-α-galactopyranose alternant régulièrement. Des polysaccharides hybrides entre agars et carraghénanes ont également été observés dans certaines Halyméniales, comme *Grateloupia lanceola* (Baeza et Matsuhira 1977).

---

<sup>5</sup> Tissu végétal composé de cellules non différenciées, dépourvu d'appareil vasculaire où l'on ne reconnaît ni feuilles, ni tiges, ni racines, qui constitue l'appareil végétatif des thallophytes.

- Les agarocolloïdes

Ils sont extraits de certaines Rhodophycées de l'ordre des *Gélidiales* (genre *Gelidium*, *Pterocladia*, *Acanthopeltis*, *Gelidiella*) et des *Gigartinales* (genre *Gracilaria*, *Graciliariopsis*, *Ahnfelia*) ou des *Ceramiales* (Pérez 1997). Ce sont des polymères à haut pouvoir gélifiant, très peu sulfatés, entre 1 et 5% (Kornprobst 2005). Ils contiennent du D et du L-galactose constituant un motif osidique (appelé carabiose) répété régulièrement. Ils sont extraits en milieu alcalin à chaud (100 à 120°C) et ont une masse moléculaire moyenne de 120 kDa mais avec des variations allant de 70 à 700 kDa (Kornprobst 2005).

- Les carraghénanes

Ils sont extraits principalement des genres *Chondrus*, *Gigartina*, *Kappaphycus* et *Hypnea* (De Reviers 2003a). Contrairement aux agars, ils sont généralement fortement sulfatés (20 à 38%) (Kloareg et Quatrano 1988) et composés exclusivement de D-galactose. Les carraghénanes sont répartis en plus de 13 familles basées sur le nombre et la position des groupements sulfates sur un type de résidu. Il existe trois principales classes : les  $\lambda$ -carraghénanes (200 à 800 kDa),  $\kappa$ -carraghénanes (260 à 320 kDa) et les  $\iota$ -carraghénanes ( $\approx$  1400 kDa) (Kornprobst 2005). Ces classes ont des propriétés différentes de par leurs différences structurales. Ainsi  $\lambda$  a un rôle d'**épaississant**<sup>6</sup> et est soluble à froid dans l'eau ;  $\kappa$  donne un gel cassant avec **synérèse**<sup>7</sup> (fixe le potassium) et est soluble à chaud dans l'eau ; enfin,  $\iota$  donne un gel élastique sans synérèse (fixe le calcium par le  $\text{SO}_4^{2-}$ ) et est soluble à chaud dans l'eau.

#### 2.1.2.2. Rôles biologiques des polysaccharides extracellulaires

Plusieurs hypothèses ont été élaborées quant aux rôles biologiques des polysaccharides extracellulaires synthétisés en fortes proportions par les organismes photosynthétiques du milieu marin (Rees 1962; Kloareg 1981; Kloareg et Quatrano 1988). L'un de ces rôles est de limiter l'évaporation de l'eau lors de la période d'émersion des algues au cours de la marée (Quillet et De Lestang 1978). Une étude a montré que les galactanes sulfatés synthétisés par les algues brunes agissent comme un tampon vis-à-vis des variations de **potentiel hydrique**<sup>8</sup> (Kloareg et Quatrano 1988). Ils joueraient aussi un rôle passif sur la régulation ionique en liant sélectivement des cations, permettant ainsi de réguler la pression osmotique

---

<sup>6</sup> Substance qui va augmenter la viscosité du liquide auquel il est additionné.

<sup>7</sup> Lorsque l'état d'agrégation du gel est assez élevé, il y a expulsion de solvant par contraction des mailles, le gel devient rigide.

<sup>8</sup> Il est noté  $\Psi$  et représente le potentiel de l'eau à quitter un compartiment biologique ou chimique donné. Plus il est élevé dans un compartiment et plus l'eau a tendance à le quitter. Toute substance en solution aqueuse exerce une force d'attraction sur les molécules d'eau. Plus la solution est concentrée et plus cette force d'attraction est forte et moins les molécules d'eau pourront la quitter.

de manière indirecte. Il a aussi été mis en évidence que la structure des polysaccharides pariétaux des algues rouges est corrélée aux paramètres environnementaux abiotiques comme la profondeur (Rees et Conway 1962).

## **2.2. Les lipides algaux**

Les macroalgues ont une faible teneur en lipides, représentant seulement environ 0,9 à 5,2% du poids sec (Floreto et Teshima 1998; Kim 2011). Cependant, sur les côtes Françaises, une étude a mesuré la teneur en lipides d'*Undaria pinnatifida* à 6,48% du poids sec (Fleurence *et al.* 1994).

Les lipides comprennent majoritairement des acides gras ainsi qu'une fraction d'insaponifiables en quantité beaucoup plus faible. Le principal acide gras insaturé est l'acide oléique (18:1  $\omega$ 9). L'acide gras saturé majoritaire est l'acide palmitique (16:0) mais on trouve également les acides myristique (14:0) et stéarique (18:0) (Fleurence *et al.* 1994).

Les algues vertes ont une teneur beaucoup plus élevée en acide oléique (18:1  $\omega$ 9) et en acide alpha-linolénique (18:3  $\omega$ 3) que les végétaux supérieurs. Les algues rouges ont un taux élevé d'acides gras polyinsaturés à 20 carbones et contiennent de l'acide eicosapentaénoïque (EPA 20:5  $\omega$ 3) ainsi que de l'acide arachidonique (20:4  $\omega$ 6) et des acides gras polyinsaturés à 18 carbones (Norziah et Ching 2000; Ortiz *et al.* 2006). Les algues brunes ont une composition lipidique comparable à celle des algues rouges.

Les acides gras polyinsaturés jouent un rôle clé dans la cellule et dans le métabolisme tissulaire, notamment dans la régulation des échanges membranaires, des électrons, et dans le transport de l'oxygène, ainsi que dans les adaptations thermiques.

## **2.3. Les protéines algales**

La composition protéique des algues a longtemps été étudiée et fréquemment comparée à d'autres protéines alimentaires comme les légumes et l'albumine de l'œuf (Fleurence 2004). Chez les algues brunes la fraction protéique est faible (3-15% du poids sec) alors qu'elle est plus élevée chez les algues vertes et rouges (10-47% du poids sec) (Fleurence 1999b). Le Tableau I présente la teneur en protéines de quelques espèces d'algues consommées en alimentation humaine.

**Tableau I : contenu protéique de quelques algues consommées comme aliments en nutrition humaine (Fleurence 2004)**

Algues	Espèces	Contenu protéique (% du poids sec)
Brunes	<i>Laminaria digitata</i>	8,0 - 15,0
	<i>Ascophyllum nodosum</i>	3,0 - 15,0
	<i>Undaria pinnatifida</i>	11,0 - 24,0
Vertes	<i>Ulva lactuca</i>	8,7 - 32,7
	<i>Ulva pertusa</i>	17,5 - 26,0
Rouges	<i>Palmaria palmata</i>	8,0 - 35,0
	<i>Porphyra tenera</i>	33,0 - 47,0
	<i>Chondrus crispus</i>	21,4

*Undaria pinnatifida* est une algue brune plus riche en protéines que d'autres espèces d'algues brunes puisqu'elle peut contenir jusqu'à 24% de protéines (Tableau I). Ceci confère un intérêt nutritionnel pour cette espèce dont le nom commercial est **wakame**<sup>9</sup>. De même pour l'algue verte *Ulva pertusa*, contenant jusqu'à 26% de protéines, qui est consommée sous le nom de **ao-nori**<sup>10</sup> au Japon. Les algues rouges sont les plus riches en protéines. Elles sont aussi riches en protéines que le soja (35% du poids sec) (Mohamed *et al.* 2012). Près de 50% de la biomasse de *Porphyra tenera* est constitué de protéines. Elle est consommée sous le nom de **nori**<sup>11</sup>. Il en est de même pour *Palmaria palmata* dont la fraction protéique représente jusqu'à 35% du poids sec. Cette algue est commercialisée sous le nom de **dulse**<sup>12</sup>.

Hormis leur utilisation directe en alimentation humaine et animale, les algues sont peu exploitées pour leurs fractions protéiques. Parmi les protéines, on trouve les phycobiliprotéines, qui constituent pourtant une voie de valorisation intéressante comme colorants naturels (Fleurence 1999b).

## 2.4. Les pigments algaux

Les pigments algaux sont nombreux et peuvent être distingués selon leur solubilité. Ainsi on trouve des pigments liposolubles que sont les chlorophylles et les caroténoïdes et des pigments hydrosolubles que sont les phycobiliprotéines.

<sup>9</sup> Nom commercial japonais utilisé pour désigner l'algue brune *Undaria pinnatifida* consommée comme légume de mer.

<sup>10</sup> Nom commercial japonais utilisé pour désigner les Entéromorphes (Ordre des *Ulvales*).

<sup>11</sup> Nom commercial japonais utilisé pour désigner essentiellement les algues rouges du genre *Porphyra* consommées comme légumes de mer.

<sup>12</sup> Nom commercial anglais utilisé pour désigner l'algue rouge *Palmaria palmata* consommée comme légume de mer.



Les chlorophylles assurent l'essentiel de la capture de l'énergie lumineuse alors que les caroténoïdes jouent le plus souvent un rôle de protection de l'appareil photosynthétique contre l'excès d'énergie lumineuse (Frank et Cogdell 1996; Vishnevetsky *et al.* 1999). Cependant, les caroténoïdes peuvent aussi contribuer de façon significative à la stabilisation de la structure de la membrane des chloroplastes (Havaux 1998) ou à la capture de l'énergie lumineuse comme cela a été montré chez certains organismes marins (Frank et Cogdell 1996).

Tous les eucaryotes photosynthétiques et les cyanophycées possèdent de la chlorophylle *a* qui se caractérise par un pic d'absorption à environ 440 nm dans le bleu et à environ 675 nm dans le rouge. L'incorporation des pigments accessoires tels que la chlorophylle *b*, la chlorophylle *c*, les phycobiliprotéines ou certains caroténoïdes, dont les pics d'absorption sont situés à des longueurs d'ondes où l'absorption de la chlorophylle *a* est faible, permet d'élargir la gamme spectrale dans laquelle l'absorption de la lumière est possible. Ainsi, la fucoxanthine et la péridinine, présentes chez certaines algues, permettent d'étendre la capacité de capture de la lumière d'environ 80 à 100 nm vers la partie rouge du spectre (Lüning 1990; Mimuro et Akimoto 2003).

Les propriétés et caractéristiques de ces différents pigments sont présentées dans les paragraphes suivants.

#### 2.4.1. Les chlorophylles

Les chlorophylles sont à l'origine de la couleur verte des végétaux. Elles sont localisées dans les chloroplastes. Ces molécules comportent un cycle tétrapyrrolique et une chaîne phytol. Différents types de chlorophylles ont été rapportées :

- La chlorophylle **a** : elle est présente chez tous les organismes photosynthétiques. Sa structure chimique est présentée en Figure 2 ;
- La chlorophylle **b** : elle est très semblable à la chlorophylle **a**, mais n'en diffère que par un aldéhyde remplaçant un groupement méthyle (Figure 2). Elle se rencontre uniquement chez les Chlorophycées ;
- La chlorophylle **c** : elle est présente chez différentes algues et existe sous trois formes que sont les chlorophylles **c<sub>1</sub>**, **c<sub>2</sub>** et **c<sub>3</sub>**. Elle diffère des autres chlorophylles par l'absence de chaîne phytol (Figure 2);
- La chlorophylle **d** : elle est proche de la chlorophylle **a** mais présente un spectre distinct. Elle diffère de la chlorophylle **a** par une substitution d'un vinyl par un aldéhyde au niveau du carbone 2 (Figure 2). Elle a été considérée comme un artefact du processus d'extraction, mais il semble reconnu aujourd'hui qu'il s'agit



d'une molécule naturelle distincte. Elle a été décrite chez différentes espèces de Rhodophycées (Rowan 1989). Elle a été observée et purifiée chez *Grateloupia dichotoma* en 1971 (O'Heocha 1971) ;

- La chlorophylle **e** : elle est présente chez les **Xanthophycées**<sup>13</sup> et les **Chrysophycées**<sup>14</sup>.

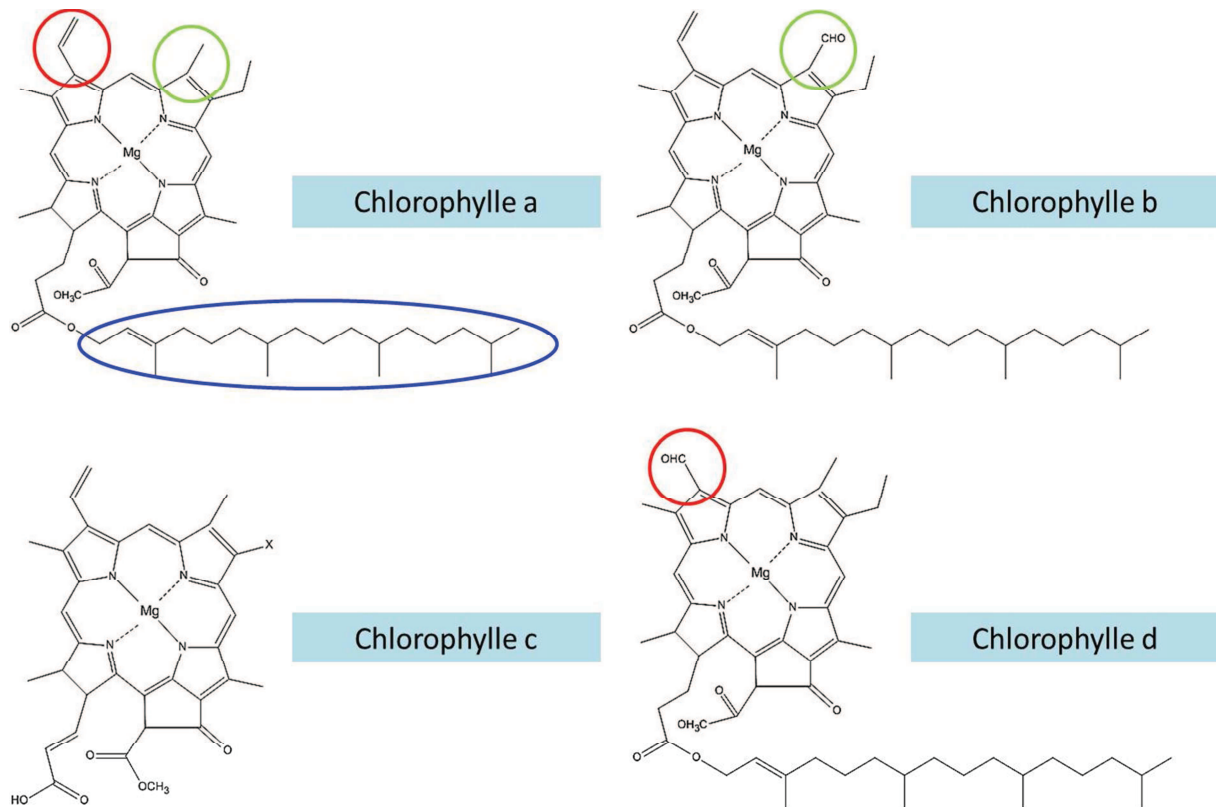


Figure 2: structure chimique des chlorophylles *a*, *b*, *c* et *d*

Les chlorophylles sont impliquées dans le processus d'oxydoréduction photochimique en assurant la collecte énergétique des photons mais aussi le transfert d'énergie permettant la transformation du dioxyde de carbone et de l'eau en molécules organiques.

#### 2.4.2. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments rouges, oranges ou jaunes liposolubles, qui se trouvent dans tous les chloroplastes et chez les cyanophycées. Comme les chlorophylles, les caroténoïdes sont situés au niveau de la membrane des thylakoïdes. Ils sont divisés en deux groupes : les carotènes et les xanthophylles. Les algues rouges synthétisent les  $\alpha$  et  $\beta$ -carotènes dans des proportions variables selon les espèces. Tout comme les algues vertes

<sup>13</sup> Algues unicellulaires généralement d'eau douce apparentées aux algues brunes quoique de couleur jaune-verte.

<sup>14</sup> Algues unicellulaires de couleur jaune doré généralement d'eau douce vivant seules ou en colonies.

et brunes, les algues rouges synthétisent des xanthophylles : lutéine, fucoxanthine et zéaxanthine. Cependant, elles produisent une xanthophylle spécifique : la taraxanthine (Kornprobst 2005).

Leur rôle n'est pas clairement établi. Chez la plupart des groupes algaux, ces pigments participent à la photosynthèse. Chez les cyanophycées et les rhodophycées, ils semblent être complètement inactifs comme pigments photosynthétiques accessoires. Ils pourraient servir de filtres pour la lumière bleue (Blinks 1964).

Cependant, ils auraient pour rôle de protéger l'appareil photosynthétique de la **photooxydation**<sup>15</sup>. Lors de forte intensité lumineuse, la violaxanthine est réduite (déépoxydée) en zéaxanthine. L'excès d'énergie non utilisée par l'antenne collectrice est alors éliminé, évitant ainsi la production d'oxygène singulet nuisible pour la cellule. Lorsque l'intensité lumineuse diminue, la zéaxanthine est à nouveau oxydée en violaxanthine (Figure 3).

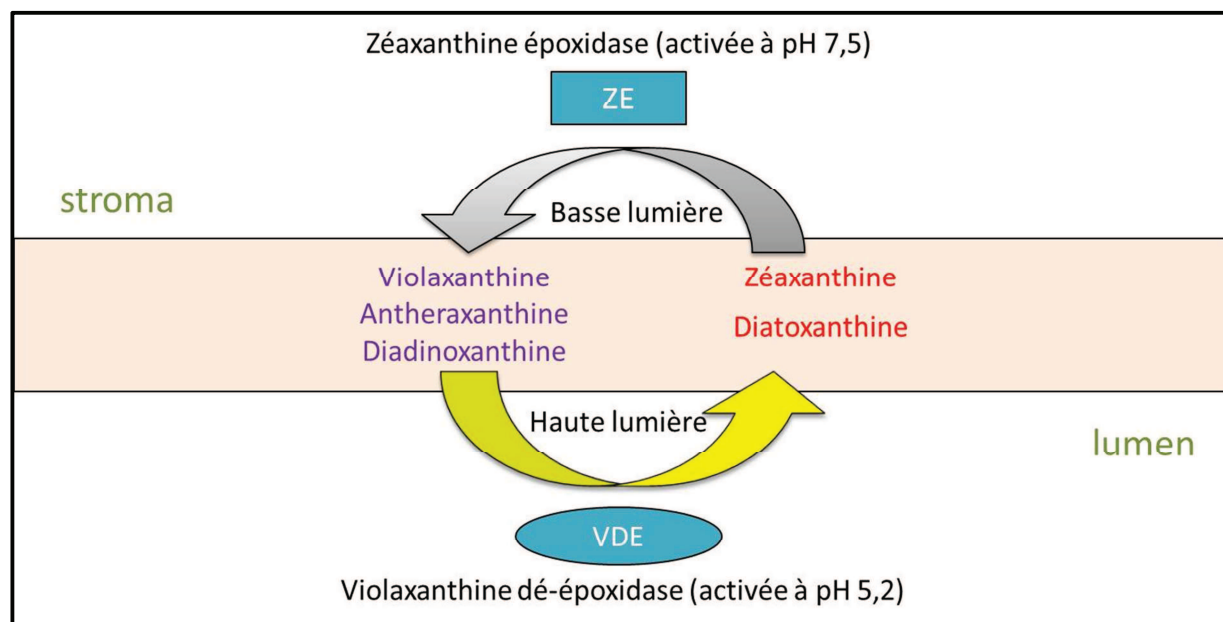


Figure 3: cycle des xanthophylles (activé en cas d'excès de lumière) d'après Rowan 1989

### 2.4.3. Les phycobiliprotéines

Contrairement aux chlorophylles et aux caroténoïdes, les phycobiliprotéines sont hydrosolubles. Elles sont constituées d'une partie protéique appelée apoprotéine et liée par des liaisons covalentes à des **chromophores**<sup>16</sup>, qui sont des groupements prosthétiques appelés bilines (Glazer 1976; Glazer *et al.* 1976). Les bilines, de structure tétrapyrrolique,

<sup>15</sup> Oxydation sous l'effet de l'énergie lumineuse.

<sup>16</sup> Partie d'une molécule responsable de sa couleur.

sont étroitement apparentés aux pigments bleus des mammifères tels que la **biliverdine**<sup>17</sup> et la **bilirubine**<sup>18</sup> (Brown *et al.* 1984). Contrairement aux chlorophylles, ces chromophores ne sont pas cyclisés.

Les phycobiliprotéines sont des pigments accessoires qui sont organisés, *in vivo*, en structures supramoléculaires appelées phycobilisomes (Gantt 1980). Ceux-ci sont localisés sur la surface externe des thylakoïdes (dans le stroma). Leurs structures, propriétés et fonctions seront détaillées ci-dessous.

Chez la plupart des cyanophycées et rhodophycées, la teneur en phycobiliprotéines est relativement importante puisqu'elle peut représenter 50% du total des protéines solubles (Gantt et Lipschultz 1974; Ke 2001) pouvant même dépasser les 60% (Tandeau de Marsac *et al.* 1980). Les phycobiliprotéines représentent jusqu'à 20% du poids sec (Bogorad 1975).

Il existe plusieurs classes de phycobiliprotéines : la phycoérythrocyanine, l'allophycocyanine, la phycocyanine et la phycoérythrine. Ce sont des protéines oligomériques composées de deux types de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  dérivant probablement d'un ancêtre commun (Glazer 1989). Le motif de base est un monomère ( $\alpha\beta$ ), de masses respectives 10 à 20 kDa pour  $\alpha$  et 14 à 22 kDa pour  $\beta$  selon l'organisme (Glazer 1984). Contrairement aux autres pigments photosynthétiques, les phycoérythrines d'algues rouges possèdent une sous-unité supplémentaire  $\gamma$  permettant d'augmenter la stabilité de la structure du pigment (Glazer et Hixson 1977; Hilditch *et al.* 1991). La R-PE contenue dans l'algue rouge *Gracilaria longa* possède une masse moléculaire apparente de 260 kDa et est caractérisée par la présence d'une sous-unité supplémentaire  $\gamma'$  (D'Agnolo *et al.* 1994).

#### 2.4.3.1. Le phycobilisome

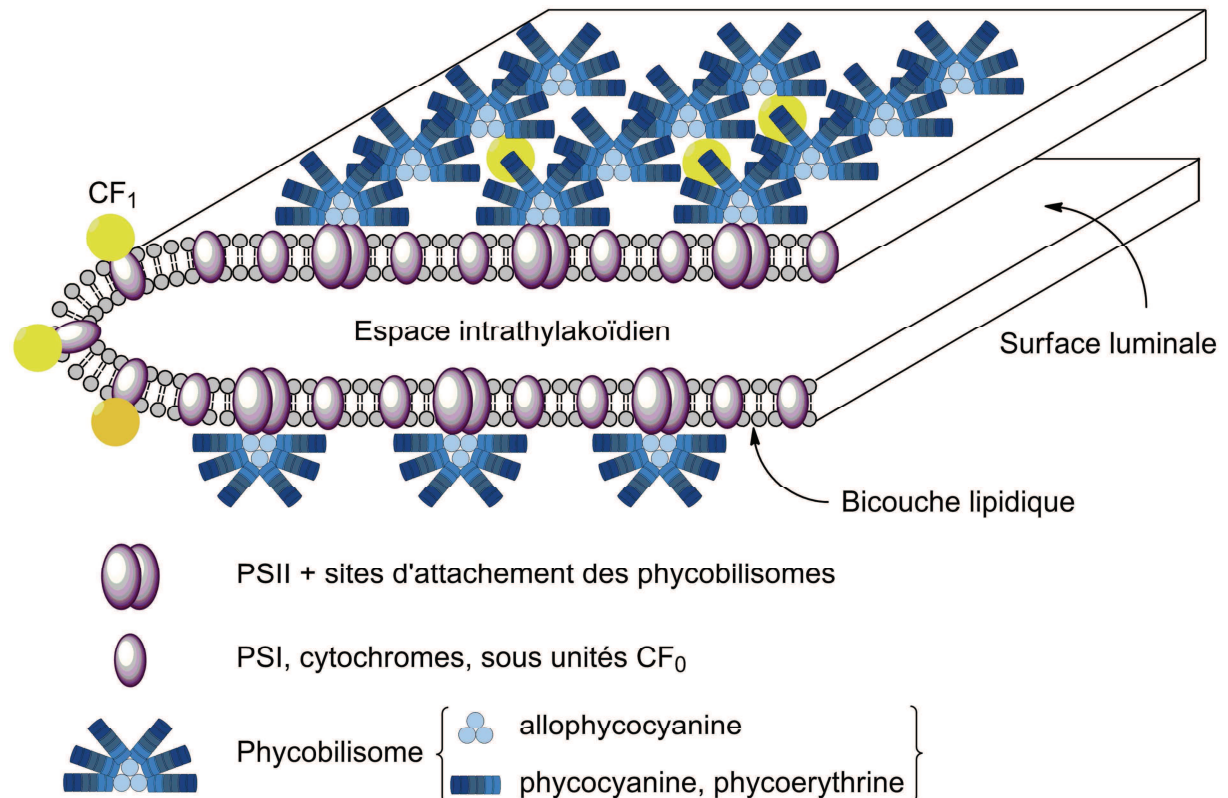
La première fonction de ce remarquable collecteur de photons est de permettre à l'organisme de survivre dans des conditions de faible luminosité. Comme les radiations jaunes et vertes sont atténuées dans les grandes profondeurs où les algues se développent, le phycobilisome possède la particularité d'absorber la lumière dans ces régions spectrales où la lumière est faiblement absorbée par la chlorophylle *a*, et il transmet cette énergie absorbée aux centres réactionnels du photosystème II avec une efficacité de plus de 95% (Glazer 1989; Gantt 1990; Ke 2001).

Il s'agit d'une structure supra-moléculaire, dont la taille varie de 30 à 60 nm de diamètre et qui est localisée à la surface de la membrane des thylakoïdes (Figure 4).

---

<sup>17</sup> Pigment vert issu de la dégradation de l'hème, précurseur de la bilirubine. Elle a une structure tétrapyrrolique ouverte non linéaire.

<sup>18</sup> Pigment jaune issu de la dégradation de l'hème. Elle a une structure tétrapyrrolique ouverte linéaire.



**Figure 4 : représentation schématique de la membrane des thylakoïdes et des phycobilisomes ; d'après Glazer 1984**

Les phycobilisomes sont proches les uns des autres (50 à 60 nm centre à centre) (Glazer 1984). Ils correspondent à une association de phycobiliprotéines permettant d'assurer le transfert de l'énergie lumineuse selon cette voie (Glazer 1977; Glazer 1984; Glazer 1985; Glazer *et al.* 1985; Glazer 1988b; Glazer 1989; Bald *et al.* 1996; Sun *et al.* 2004) (Figure 5):



**Figure 5 : voie de transfert de l'énergie lumineuse au sein du phycobilisome**

Ainsi, ces structures ont une fonction essentielle qui consiste à assurer un transfert de l'énergie d'excitation de manière hautement efficace depuis les chromophores absorbants dans le vert (comme pour la phycoérythrine) vers ceux absorbants le plus éloigné dans le rouge (comme pour l'allophycocyanine et l'allophycocyanine B) (Glazer 1977).

Le phycobilisome est présent chez les Rhodophycées et Cyanophycées mais absent chez les **Cryptophycées**<sup>19</sup>, dans lesquelles les pigments assurent un transfert d'énergie direct avec la chlorophylle *a* (Gantt 1980).

Plusieurs types structuraux ont été mis en évidence, mais deux sont majoritaires :

- les phycobilisomes de structure simple, de forme hélicoïdale, présents chez les Rhodophycées et les Cyanophycées,
- les phycobilisomes globulaires dont la structure est plus complexe et qui sont présents chez différentes Rhodophycées.

Ces phycobilisomes ne contiennent pas uniquement des phycobiliprotéines mais également des polypeptides de liaison (symbolisés « L ») représentant environ 15% du contenu protéique du phycobilisome (ce pourcentage varie selon les espèces) (Tandeau de Marsac et Cohen-bazire 1977). Leur rôle est d'une part d'assurer la fixation des phycobilisomes à la surface des thylakoïdes au niveau du photosystème II, mais également de stabiliser la structure des phycobilisomes. Par ailleurs ils assurent la cohésion des phycobiliprotéines dans le phycobilisome. En effet, tandis que les phycobiliprotéines sont acides et hydrophiles, les polypeptides de liaison sont basiques et hydrophobes, d'où les interactions entre ces constituants (Ke 2001). Chez la R-Phycoérythrine, la sous-unité gamma fonctionne comme un polypeptide de liaison, mais elle porte aussi des chromophores contrairement aux polypeptides de liaison (Glazer et Hixson 1977). Ces protéines de liaison ont été divisées en 4 groupes selon leur masse moléculaire (Glazer 1984; Ducret *et al.* 1998) :

- groupe I ou L<sub>CM</sub> (70 à 120 kDa) : fixation des phycobilisomes aux membranes thylakoïdiennes. Ils agissent comme des émetteurs terminaux de l'antenne collectrice et participent au transfert de l'énergie lumineuse vers le photosystème II ;
- groupe II ou L<sub>R</sub>, L<sub>RC</sub> (25 à 35 kDa) : maintien des assemblages de phycobiliprotéines en bâtonnets et fixation de ceux-ci à l'allophycocyanine qui constitue le centre du phycobilisome ;
- groupe III (12 à 22 kDa) : ce sont les sous-unités des phycobiliprotéines ainsi qu'un polypeptide de 18,3 kDa et la sous-unité alpha de l'allophycocyanine B;
- groupe IV ou L<sub>C</sub> (9 à 12 kDa) : assemblage et fixation du centre du phycobilisome.

Les polypeptides de liaison déterminent l'état d'agrégation de la phycobiliprotéine et influencent les positions occupées par les différentes sous-unités les unes par rapport aux autres, et ainsi que la conformation des chromophores dans ces agrégats (Glazer 1984).

---

<sup>19</sup> Algues unicellulaires vivant dans tout milieu aquatique (milieux océaniques aux eaux douces) de couleur brune.



Les phycobiliprotéines sont alors associées et forment des assemblages constituant le phycobilisome. Ce dernier est composé de six bâtonnets organisés autour d'un domaine central (Figure 6).

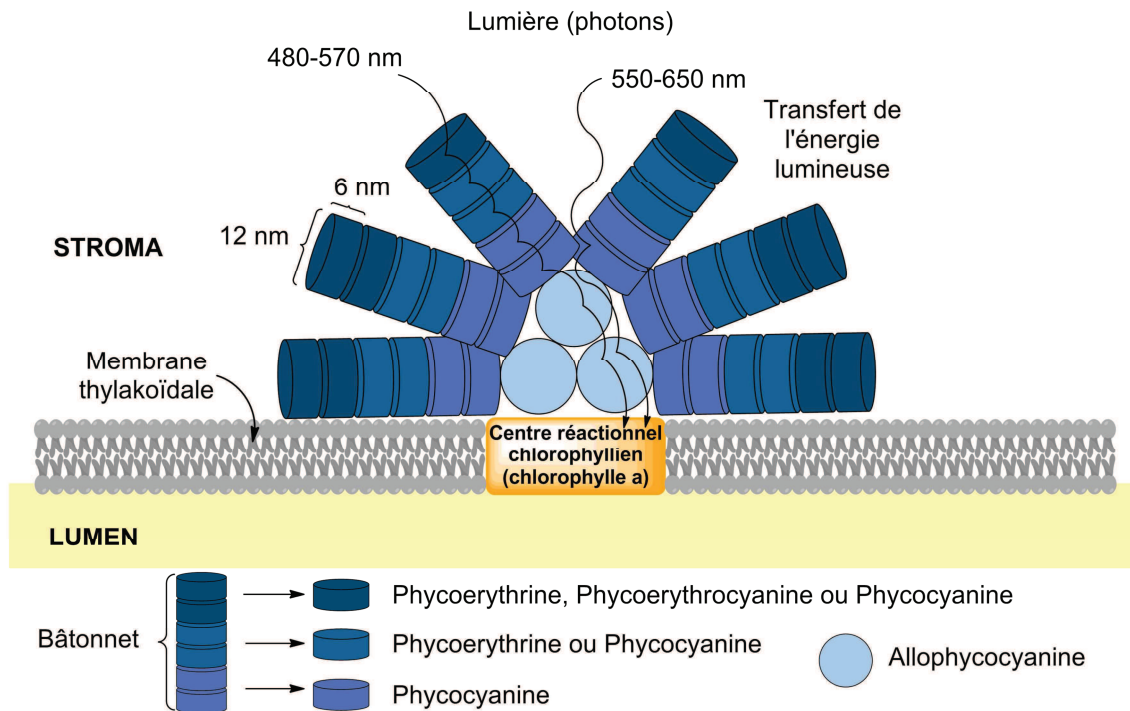


Figure 6 : schéma de la structure du phycobilisome d'après Glazer 1982

Le domaine central est composé d'allophycocyanine (APC), tandis que les bâtonnets sont constitués des autres phycobiliprotéines, dont la composition varie selon l'espèce. Le domaine central est composé de trois cylindres, eux-mêmes constitués de deux à quatre disques, comprenant eux-mêmes un trimère d'allophycocyanine.

Au niveau des bâtonnets, les disques renferment des hexamères des diverses phycobiliprotéines (autres que l'APC), formés à l'aide d'un polypeptide de liaison. La formation de ces disques est représentée schématiquement dans la Figure 7.

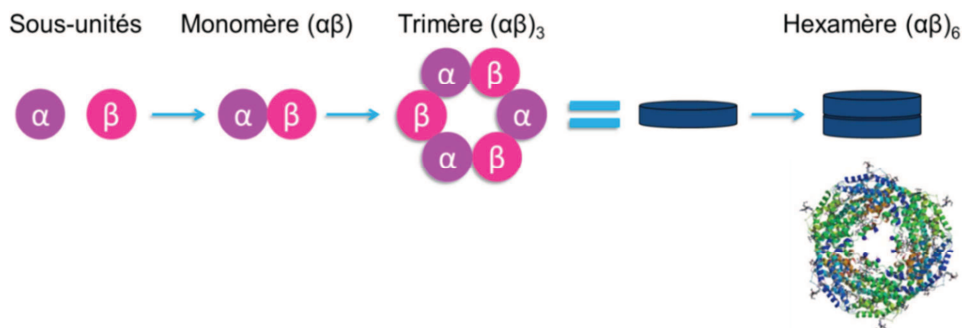
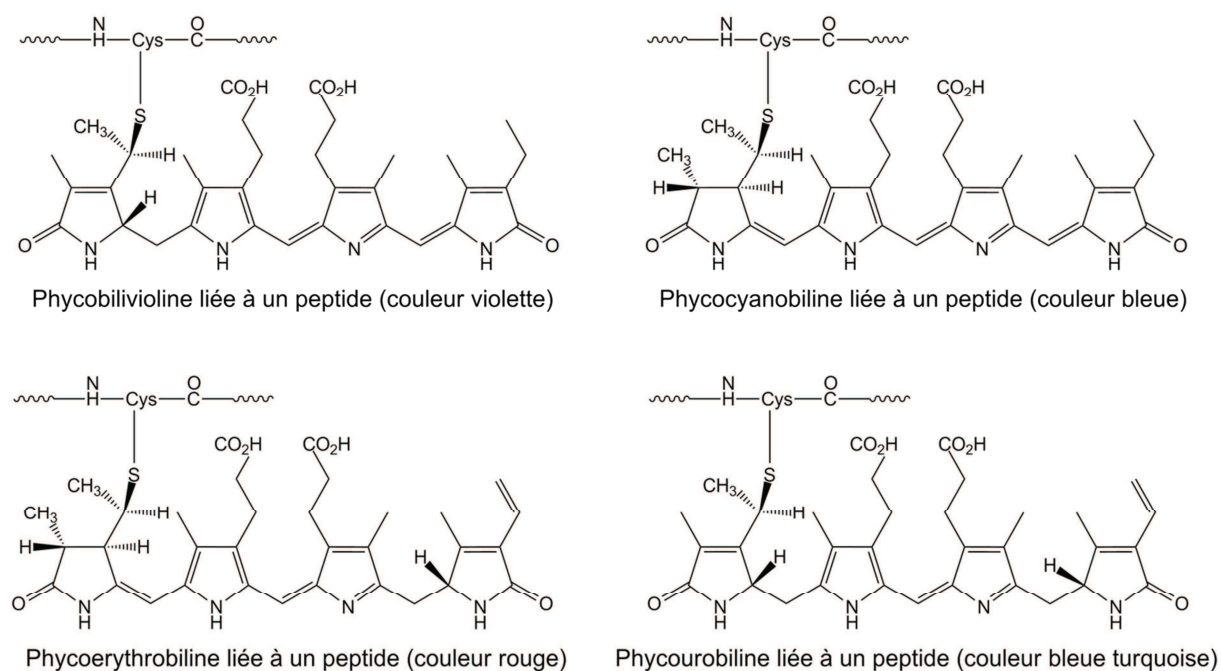


Figure 7 : représentation schématique de l'assemblage de trimères et hexamères de phycobiliprotéines à partir des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  d'après Ke 2001

## 2.4.3.2. Structure des chromophores

Les propriétés spectrales des phycobiliprotéines sont dues à des chaînes tétrapyrroliques ouvertes et liées par des liaisons covalentes (thioéther) à des cystéines bien spécifiques de l'apoprotéine (Chang *et al.* 1996). Il existe quatre types de chromophores chez les Cyanophycées et les Rhodophycées. Les plus connus ancestralement sont la phycocyanobiline (PCB) et la phycoérythrobiline (PEB), dont les structures sont présentées en Figure 8. Par la suite, deux autres chromophores ont été identifiés : la phycourobiline (PUB) et la phycobilivioline (PXB), dont les structures sont observables également sur la Figure 8 (Glazer 1988a).



**Figure 8 : structure chimique des différents chromophores d'après Glazer 1988a**

Les chromophores diffèrent par leur longueur d'onde d'absorption maximale. Ainsi la PCB a un  $\lambda_{\max}$  de 620 à 660 nm, la PEB a un  $\lambda_{\max}$  de 535 à 567 nm, la PUB a un  $\lambda_{\max}$  de 498 nm et la PXB a un  $\lambda_{\max}$  de 568 nm (Apt *et al.* 1995). La PXB est une phycobilivioline minoritaire présente uniquement sur la sous-unité  $\alpha$  de la phycoérythrocyanine, elle a donc été peu étudiée.

## 2.4.3.3. Les différentes phycobiliprotéines

Dans un premier temps elles ont été distinguées en deux catégories sur la base de la coloration avec d'une part les phycoérythrines de couleur rose clair et de **fluorescence**<sup>20</sup> jaune orangée, et d'autre part les phycocyanines de couleur bleue et de fluorescence rouge.

<sup>20</sup> Propriété de certains composés qui, lorsqu'ils reçoivent une radiation, en émettent ensuite une moins énergétique, c'est-à-dire de plus grande longueur d'onde.

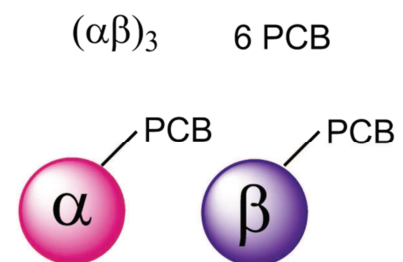
Elles ont ensuite été classées en trois groupes d'après la nature chimique des chromophores et les spectres d'absorption des protéines natives (Bogorad 1975; Glazer et Hixson 1975). Ainsi des préfixes ont été utilisés afin de classer les sous-classes de phycobiliprotéines : C faisant référence aux Cyanophycées, R aux Rhodophycées et B aux Bangiales (famille d'algues rouges) (Kornprobst 2005). Chez certaines algues, une quatrième classe a été mise en évidence : la phycoerythrocyanine aux propriétés spectrales semblables à celles de la phycoérythrine (Bryant *et al.* 1976).

- L'allophycocyanine (APC, bleu-vert,  $\lambda_{\max} = 650-660$  nm) ;
- La phycocyanine (PC, bleu,  $\lambda_{\max} = 610-625$  nm) ;
- La phycoérythrocyanine (PEC, orange,  $\lambda_{\max} = 560-600$  nm) ;
- La phycoérythrine (PE, rose-violet,  $\lambda_{\max} = 490-570$  nm).

Cette classification repose essentiellement sur les différences existant au niveau des chromophores.

### L'allophycocyanine

L'allophycocyanine correspond à un trimère  $(\alpha\beta)_3$  d'une masse moléculaire d'environ 110 kDa. Elle porte une phycocyanobiline sur chaque sous-unité, soit 6 chromophores par trimère  $(\alpha\beta)_3$  (Figure 9). Son maximum d'émission de fluorescence est de 660 nm et son maximum d'absorption de 650 nm (Glazer 1994). C'est ainsi qu'elle est considérée comme la « chlorophylle *b* » des algues bleues-vertes et des algues rouges en absorbant à la même longueur d'onde (Bogorad 1975). C'est un pigment minoritaire représentant seulement 5% des protéines hydrosolubles chez *Porphyridium cruentum* (Gantt et Lipschultz 1974). Il aurait une fonction intermédiaire dans la chaîne de transfert de l'énergie vers les centres réactionnels de la chlorophylle *a*. L'allophycocyanine constitue le centre des phycobilisomes autour duquel s'articulent les phycoérythrines et les phycocyanines. Il existe une autre allophycocyanine, l'allophycocyanine B, découverte chez les Cyanophycées et Rhodophycées, qui serait le dernier élément de la chaîne de transfert (Glazer et Bryant 1975). Son maximum d'émission de fluorescence est de 675 nm et elle présente deux pics maximum d'absorption à 618 et 671 nm (Bryant 1982).



**Figure 9: structure de l'allophycocyanine**



### La phycocyanine

La phycocyanine est présente chez les Cyanophycées, les Rhodophycées et les Cryptophycées. Il existe ainsi deux types de phycocyanines :

La C-phycocyanine ou C-PC, qui est la plus répandue. Elle est composée de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  permettant de donner une forme hexamérique  $(\alpha\beta)_6$  à des pH de 5-6 et une forme trimérique à pH 7 (Glazer et Cohen-Bazire 1971). Chez *Spirulina fusiformis*, la C-PC représente 6 à 46% du poids sec (Minkova *et al.* 2003) et 26% chez *Spirulina platensis* (Zhang et Chen 1999). Son maximum d'absorption est de 620 nm tandis que son maximum d'émission de fluorescence est de 640 nm (Bryant 1982).

La R-phycocyanine ou R-PC est un composant minoritaire chez les Rhodophycées. Elle possède une structure oligomérique où les sous-unités  $\alpha$  sont bleues et les sous-unités  $\beta$  sont rouges pourpres (Glazer et Hixson 1975). Elle peut se trouver sous forme de trimère mais aussi d'hexamère. Son maximum d'émission de fluorescence est de 636 nm et elle absorbe à 555 et à 617 nm (Bryant 1982).

### La phycoérythrocyanine

Cette phycobiliprotéine a été décrite pour la première fois en 1976 (Bryant *et al.* 1976). Elle est présente chez quelques Cyanophycées qui ne synthétisent pas la phycoérythrine. Elle constitue une alternative possible pour l'absorption de la lumière à des longueurs d'ondes voisines de celles absorbées par la phycoérythrine (568 nm au lieu de 565 nm). Elle se présente sous forme de trimère ou d'hexamère. Son maximum de fluorescence est de 625 nm et elle absorbe à 570 nm et présente un épaulement à 595 nm (Bryant 1982).

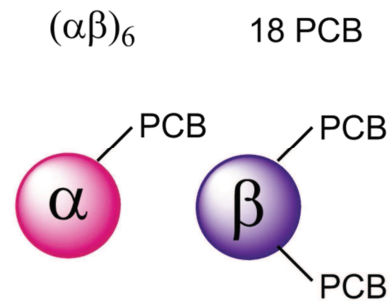


Figure 10 : structure de la C-phycocyanine

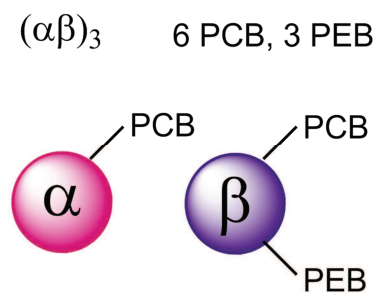


Figure 11 : structure de la R-phycocyanine

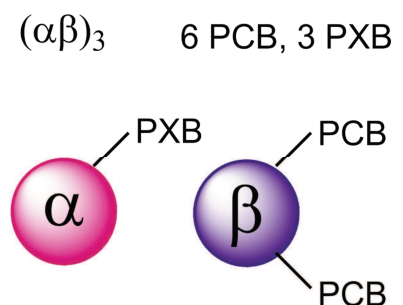


Figure 12 : structure de la phycoérythrocyanine

## La phycoérythrine

C'est le pigment majoritaire des Rhodophycées mais elle est également synthétisée par les Cyanophycées (Glazer 1994). Tout comme les autres phycobiliprotéines, il existe différentes phycoérythrines : la R-PE (R pour Rhodophycées), la B-PE et la b-PE (B pour Bangiales), et la C-PE (C pour Cyanophycées). Elles sont divisées en différentes classes selon leur spectre d'absorption. La B-PE et la R-PE sont les plus abondantes chez les algues rouges. Elles sont isolées sous forme de complexes  $(\alpha\beta)_6\gamma$  et présentent des masses moléculaires allant de 240 à 260 kDa (Sun *et al.* 2009) alors que la C-PE est isolée sous forme d'un complexe  $(\alpha\beta)_6$ .

La R-PE est la phycobiliprotéine la plus abondante chez les algues rouges (Glazer 1984). Elle est présente chez les Rhodophycées mais également chez les Cyanophycées (Bryant 1982). C'est une protéine oligomérique d'environ 240 kDa isolée sous forme hexamérique  $(\alpha\beta)_6\gamma$  (Glazer 1989; Galland-Irmouli *et al.* 2000). Cette sous-unité  $\gamma$  est localisée dans la cavité centrale de la molécule pour assembler les trimères  $(\alpha\beta)_3$  qui se font face. Ainsi cette sous-unité confère une plus grande stabilité à la phycobiliprotéine (Wang *et al.* 1998). Elle présente deux pics d'absorption à 540 et 565 nm et un épaulement à 498 nm. Son maximum d'émission de fluorescence se situe entre 575 et 580 nm selon l'organisme.

La B-phycoérythrine est la phycobiliprotéine caractéristique des algues rouges de l'ordre des Bangiales (Gantt et Lipschultz 1974). Elle a une masse d'environ 245 kDa et représente 2 à 6% du poids sec (Reboloso Fuentes *et al.* 2000; Kathiresan *et al.* 2007). Tout comme la R-PE, elle est isolée sous forme hexamérique  $(\alpha\beta)_6\gamma$ , possède les mêmes chromophores, mais présente un spectre d'absorption différent puisqu'elle a un double pic à 545 et 565 nm et un épaulement à 498 nm (Glazer 1977; Glazer 1982; Tchernov *et al.* 1993). Son maximum de fluorescence est de 575 nm (Glazer 1977).

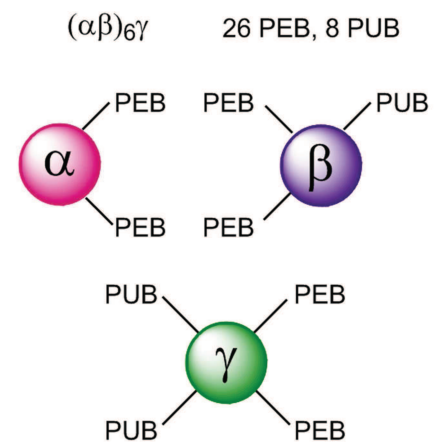


Figure 13 : structure de la R-phycoérythrine

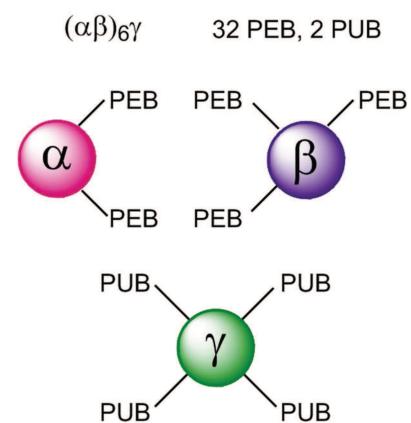


Figure 14 : structure de la B-phycoérythrine

La b-phycoérythrine est synthétisée par les mêmes organismes que la B-PE mais est isolée sous la forme d'un complexe  $(\alpha\beta)_n$  où  $n$  est compris entre 1 et 6. Elle a une masse moléculaire inférieure à la B-PE mais présente de grandes similitudes structurales. Il semblerait qu'elle soit un élément de la B-PE (Glazer et Hixson 1977).

Cependant elle ne porte qu'un seul type de chromophore (PEB) et présente un pic d'absorbance maximale à 545 nm et un épaulement à 565 nm. Son maximum d'émission de fluorescence est de 570 nm.

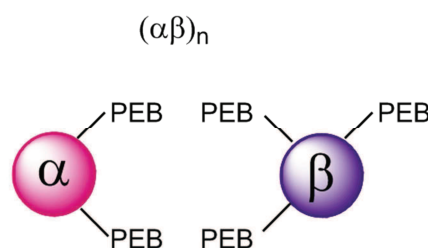


Figure 15 : structure de la b-phycoérythrine

La C-phycoérythrine est synthétisée par les Cyanophycées et est isolée sous la forme hexamérique essentiellement (aussi trimérique). Elle porte cinq à six chromophores (PEB) et présente un pic d'absorption à 560 nm. Son maximum d'émission de fluorescence est de 577 nm (Bryant 1982).

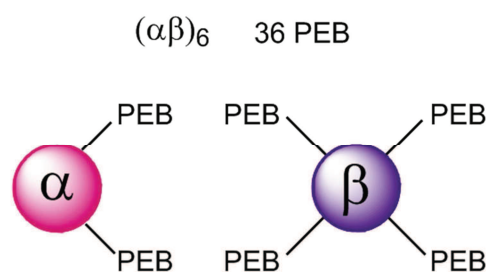


Figure 16 : structure de la C-phycoérythrine

#### 2.4.4. Stratégies d'extraction et de purification de la phycoérythrine

Afin de caractériser la R-phycoérythrine de *Grateloupia turuturu*, ce qui n'a encore jamais été réalisé à ce jour, il est indispensable de mettre en œuvre un procédé de purification. Une fois le protocole mis au point, le pigment purifié peut être ensuite analysé puis caractérisé (masse moléculaire, structure, point isoélectrique (pI), sous-unités...). Cette caractérisation permet de comparer ce pigment à ceux produits par d'autres espèces d'algues rouges. Elle permet également de mettre en évidence un lien entre ce pigment et les facultés d'adaptation de l'algue (Talarico et Maranzana 2000).

Concernant les potentialités d'applications commerciales de la R-PE, en tant que colorant alimentaire et plus particulièrement comme marqueur de fluorescence, la pureté du pigment est un facteur essentiel (Sekar et Chandramohan 2008; Sun *et al.* 2009). Les phycobiliprotéines doivent être extraites du phycobilisome et purifiées afin de pouvoir être valorisées. Les méthodes d'extraction vont dépendre du modèle d'étude, elles sont décrites ci-après dans le paragraphe 2.4.4.1. Il n'existe donc pas de méthode standardisée pour extraire quantitativement un pigment protéique d'une algue. Une méthode mise au point

pour un organisme n'est peut-être pas la méthode optimale pour un autre organisme. Une optimisation des conditions d'extraction et de purification n'est donc réalisable qu'espèce par espèce (Fleurence 1999a).

#### 2.4.4.1. Méthodes d'extraction

Il existe plusieurs méthodes physiques et chimiques de destruction cellulaire et d'extraction protéique. Les méthodes sont également différentes selon le modèle d'étude microalgue/macroalgue. Ainsi, les méthodes présentées ci-dessous sont les méthodes utilisées pour les macroalgues.

La macération d'algues fraîches est une procédure classique. Elle se déroule pendant plusieurs jours (Claire 1992; Fleurence 2003) et permet l'extraction du contenu protéique cellulaire par choc osmotique (Fleurence et Guyader 1995). La macération se fait dans de l'eau distillée ou le plus souvent dans un tampon phosphate ou acétate à un pH proche de la neutralité et à une concentration molaire de 5 mM. Cette méthode a été testée sur plusieurs espèces telles que *Gracilaria sp.* (Fleurence et Guyader 1995), *Laurencia pinnatifida*, *Dilsea carnosa*, *Chondrus crispus* (Claire 1992). Le temps de diffusion des pigments est variable d'une espèce à une autre et peut durer plusieurs jours. Cette méthode est donc dépendante du modèle d'étude. Cette méthode d'extraction est très chronophage et les protéases libérées induisent une dégradation partielle de la phycoérythrine (Fleurence 2003). Afin d'éviter l'oxydation des groupements thiols, différents auteurs ont conseillé d'ajouter du mercaptoéthanol (Bryant *et al.* 1976; Bryant *et al.* 1978). Une étude de 2001 a montré que le mercaptoéthanol a un effet protecteur sur la fluorescence de la R-PE (Orta-Ramirez *et al.* 2001). Cependant en 1984, Guard-Friar et MacColl ont montré que le mercaptoéthanol pouvait altérer les propriétés spectrales des phycobiliprotéines. L'azide de sodium peut également être utilisé comme inhibiteur de la croissance microbienne (Glazer et Hixson 1975; Bryant *et al.* 1976; Bryant 1982; Glazer 1982).

La plupart des techniques utilisées à ce jour sont basées sur une destruction cellulaire : le broyage avec une presse de French après congélation (Glazer et Cohen-Bazire 1971), éclatement par ultrasons (Koller et Wehrmeyer 1975) ou par homogénéisation (Glazer 1982) ou encore par cycles de congélation/décongélation (Glazer *et al.* 1971). La plus utilisée est le broyage à l'azote liquide permettant l'obtention d'une poudre fine à partir de laquelle la phycoérythrine est extraite grâce à l'ajout d'un tampon phosphate (Hilditch *et al.* 1991; MacColl *et al.* 1996; Galland-Irmouli *et al.* 2000). Dans presque tous les cas, les pigments extraits sont précipités au sulfate d'ammonium à différentes concentrations selon le pigment étudié. Une méthode d'extraction plus récente est l'hydrolyse enzymatique. L'extraction est

basée sur la dégradation de la paroi cellulaire par des enzymes comme des xylanases et des cellulases, seules ou couplées, spécifiques des parois de l'espèce algale ciblée (Fleurence *et al.* 1995; Denis *et al.* 2009b; Dumay *et al.* 2013).

#### 2.4.4.2. Méthodes de purification

Tout comme les méthodes d'extraction, il existe différentes méthodes de purification qui s'avèrent adaptées ou non selon le matériel étudié. La précipitation au sulfate d'ammonium ( $\nabla$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) est habituellement employée comme étape de pré-purification avec différents pourcentages de saturation (25 à 85%) selon les espèces (Hilditch *et al.* 1991; Kaixian *et al.* 1993; Bermejo *et al.* 2001; Liu *et al.* 2005; Sun *et al.* 2009). Les méthodes de purification sont essentiellement des méthodes chromatographiques : la chromatographie d'échange d'ions (EI) ainsi que la chromatographie de gel filtration (GF) seules ou en association. La chromatographie de gel d'hydroxyapatite est également utilisée en association avec la chromatographie de gel filtration. L'ultrafiltration (UF) est utilisée afin de concentrer et de purifier les extraits. L'électrophorèse préparative est aussi utilisée comme méthode de purification. Les différentes techniques utilisées sur plusieurs espèces d'algues et les IP (Indice de Pureté) obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau II : techniques de purification de la R-PE de plusieurs espèces d'algues rouges et IP obtenus**

Méthode	Espèce	Rendement extraction (mg.g <sup>-1</sup> )	IP	Référence bibliographique
∇ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + GF + EI + UF + GF	<i>Corallina officinalis</i> (R-PE)	0,080 (MF)	4,7	Hilditch <i>et al.</i> 1991
EI + UF + ∇ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<i>Ceramium isogonum</i> (R-PC)	0,038 (MS)	2,10	Kaixian <i>et al.</i> 1993
Electrophorèse préparative	<i>Palmaria palmata</i> (R-PE)	0,450 (MS)	3,2	Galland-Irmouli <i>et al.</i> 2000
GF + EI	<i>Palmaria palmata</i> (R-PE)	0,122 (MF)	3,5	Wang 2002
Hydroxyapatite + GF	<i>Corallina elongata</i> (R-PE)	0,600 (MS)	6,67	Rossano <i>et al.</i> 2003
∇ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + EI	<i>Polysiphonia urceolata</i> (R-PE)	1,780 (MF)	5,59	Liu <i>et al.</i> 2005
GF + hydroxyapatite	<i>Polysiphonia urceolata</i> (R-PE)	0,340 (MF)	3,90	Niu <i>et al.</i> 2006
GF + EI	<i>Polysiphonia urceolata</i> (R-PE)	0,400 (MF)	3,26	Niu <i>et al.</i> 2006
GF 1 + GF 2	<i>Heterosiphonia japonica</i> (R-PE)	?	4,35	Sun <i>et al.</i> 2009
GF + EI	<i>Heterosiphonia japonica</i> (R-PE)	?	4,89	Sun <i>et al.</i> 2009
∇ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + hydroxyapatite	<i>Porphyra yezoensis</i> (R-PE et R-PC)	0,940 (MS) 1,650 (MS) 3,230 (MS)	>3,2	Chuner <i>et al.</i> 2012

NB : MF = Masse Fraiche ; MS = Masse Sèche ; GF = chromatographie de gel filtration ; EI = chromatographie d'échange d'ions ; ∇ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = précipitation au sulfate d'ammonium ; UF = ultrafiltration

Ainsi, plusieurs étapes sont nécessaires pour purifier les phycobiliprotéines de façon satisfaisante. Ces étapes induisent un coût élevé et confèrent donc une forte valeur ajoutée aux phycobiliprotéines. Celle-ci est également induite par le faible rendement d'extraction

compris entre 0,038 et 3,230 mg.g<sup>-1</sup> MS (Tableau II). De manière générale, il semble que l'extraction à partir de biomasse sèche présente les meilleurs rendements.

Le Tableau III présente les prix appliqués par les fournisseurs de phycobiliprotéines. Ces prix sont compris dans une fourchette de 5 à 489 € le mg pour la R-PE. Ceci s'explique par la quantité commandée, mais également probablement par des différences de pureté du pigment (IP non mentionné par les fournisseurs). L'espèce dont le pigment est issu est rarement mentionnée. Les fournisseurs recommandent de stocker les extraits à 4°C et de ne surtout pas les congeler. Ils sont maintenus dans une suspension de sulfate d'ammonium et peuvent être conservés jusqu'à 12 mois.

**Tableau III : comparaison des prix fournisseurs de différentes phycobiliprotéines**

Fournisseur	Phycobiliprotéine	Espèce	Prix	Quantité
Invitrogen	R-PE	?	258 €	500 µL
	B-PE	?	258 €	500 µL
Prozyme	C-PC	?	10 à 20 €	1 mg
	B-PE	?	38,70 €	1 mg
	R-PE	?	5 à 20 €	1 mg
Chromaprobe	R-PE (IP>5,3)	<i>Ceramium rubrum</i>	15,5 €	1 mg
Sigma	R-PE	<i>Corallina officinalis</i>	489 €	1 mg
Anaspec	R-PE	?	47,3 €	1 mg
Thermo Scientific Pierce	R-PE	<i>Porphyra tenera</i> ou <i>Gastroclonium coulterii</i>	304 €	2 mg

La stabilité des produits naturels représente un problème majeur dans le développement de leur utilisation industrielle. Les colorants naturels sont souvent des produits bruts, renfermant de nombreux composés inutiles, rendant leur valorisation plus difficile, car nécessitant des étapes supplémentaires de purification. Or, *in situ*, le pigment est dans les conditions les plus sales car il est naturellement complexé ou associé à des co-pigments. Leur purification ne présente pas que des avantages car si elle permet d'éliminer certaines substances indésirables qui peuvent perturber la solubilité, le goût ou l'odeur du produit, elle peut également supprimer des composés stabilisants.



### 3. Applications des macroalgues et molécules d'intérêt économique

Bien que chaque année, 15 milliards de tonnes de produits fabriqués à base d'algues soient élaborés dans le monde, les algues sont toujours considérées comme une bioressource sous-utilisée (Wajahatullah *et al.* 2009). Les cinq grands secteurs d'activités industrielles concernés par les algues marines sont (par ordre décroissant en valeur) :

- La production d'algues alimentaires (50%). Elles sont soit directement consommées fraîches ou bien transformées par le biais de l'industrie agro-alimentaire pour obtenir des produits séchés, congelés, en saumure, ou encore incorporées dans des aliments (tartares, terrines, pâtes, sushis,...). Elles sont utilisées en tant que légumes, condiments ou ingrédients.
  - L'industrie des **phycocolloïdes**<sup>21</sup> (40%). Elles sont principalement utilisées dans l'industrie agroalimentaire. Elles sont consommées indirectement en tant que PAI (Produit Alimentaire Intermédiaire) par l'extraction de certaines substances telles que les alginates, l'agar-agar et les carraghénanes qui sont employées comme agents **gélifiants**<sup>22</sup>-texturants en remplacement des gélatines d'origines animales, épaississants, émulsifiants ou stabilisants.
  - La recherche et le développement dans le domaine de la santé.
  - La cosmétologie et les industries dérivées.
  - L'agriculture et l'élevage.
- } (10%)

Le secteur de l'algue alimentaire est de loin le secteur le plus important en termes de valeur de tonnage (50% de la production) et de valeur financière. Cependant il ne concerne pratiquement que les pays asiatiques où la consommation d'algue est une habitude alimentaire ancestrale.

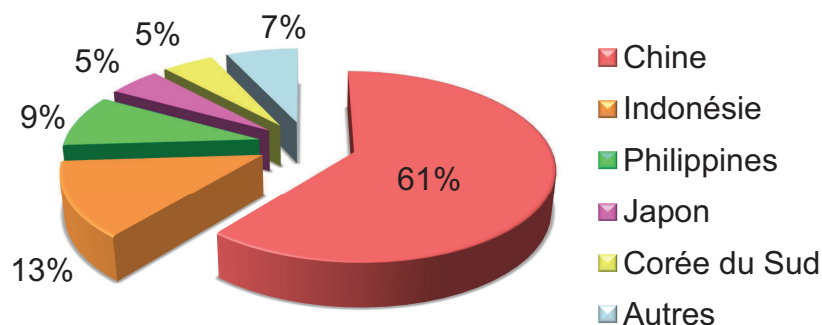
Ainsi, les cinq premiers pays consommateurs d'algues sont : la Chine (61%), l'Indonésie (13%), les Philippines (9%), le Japon (5%) et la Corée du Sud (5%) (Figure 17).

---

<sup>21</sup> Substance mucilagineuse (qui gonfle au contact de l'eau) extraite des algues (alginates, carraghénanes, agars).

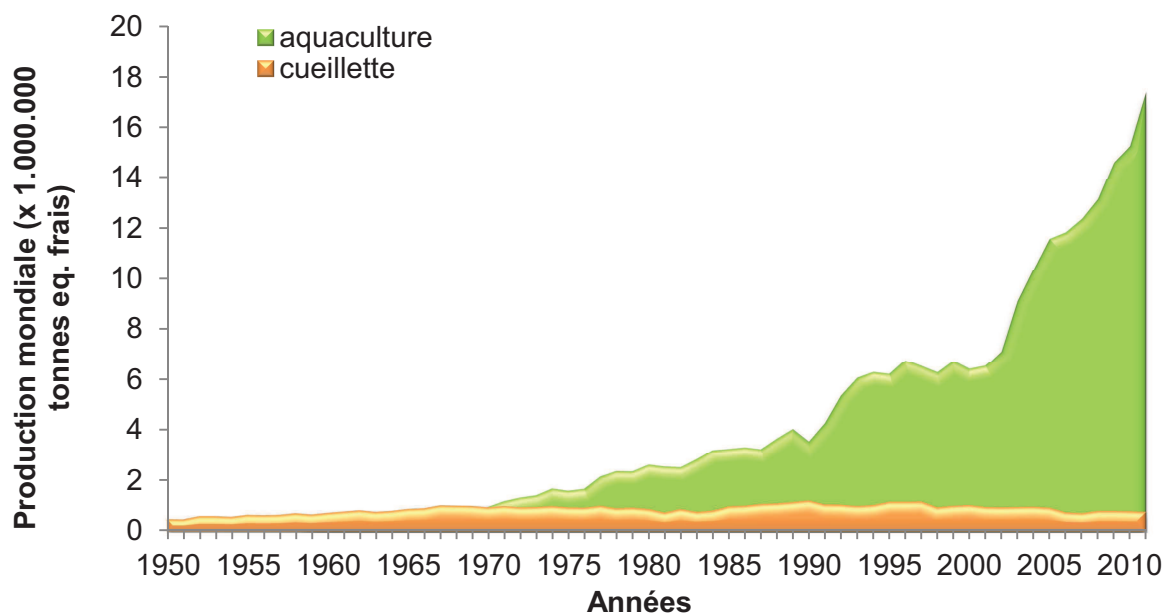
<sup>22</sup> Substance destinée à gélifier. Le gélifiant agit en modifiant la structure interne du liquide auquel il est additionné, à chaud ou à froid, aboutissant à une structure finale tridimensionnelle par réticulation.





**Figure 17 : répartition de la consommation mondiale d'algue entre les principaux pays (Breizh'alg 2012)**

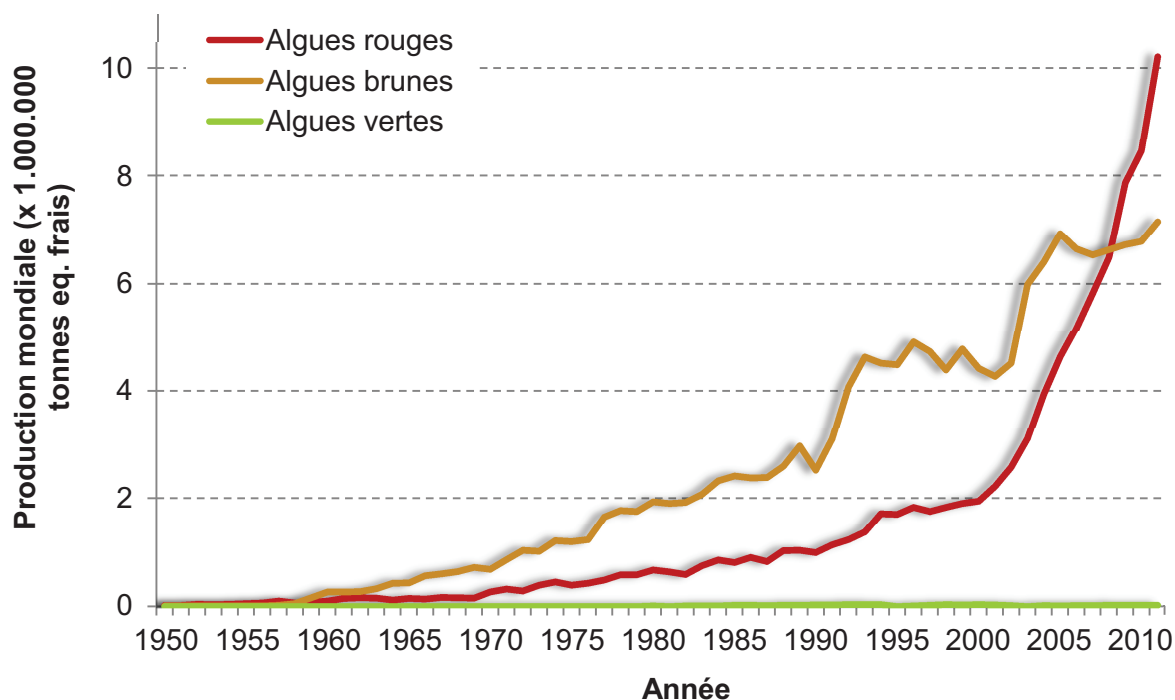
En ce qui concerne les pays occidentaux industrialisés (Europe et Amérique du Nord), la consommation d'algues se fait au travers des phycocolloïdes (40% de la production) utilisés en tant qu'additifs alimentaires (gélifiants, épaississants, stabilisants, etc.). Dans les domaines de la santé, de la cosmétologie et de l'agriculture (10% de la production), les applications industrielles sont de plus en plus nombreuses et seront détaillées ci-après. Aujourd'hui, de nombreux industriels sont engagés dans la recherche de molécules synthétisables, dotées de propriétés fonctionnelles ou pharmacologiques innovantes, capables par exemple de répondre aux problèmes de résistance (antibiotiques, antipaludéens, antitumoraux, antiviraux...) mais aussi de faire face à des consommateurs de plus en plus soucieux des produits qu'ils consomment. Se pose ainsi le problème de la gestion et de la conservation de ces ressources marines. La culture de macroalgues permet de maîtriser ces aspects. Dans les années 50, la production mondiale était due uniquement à la cueillette (93,7%) puis l'aquaculture s'est progressivement développée jusqu'aux années 1990 (26,2% par cueillette et 73,8% par culture). Depuis les années 1990, la production par aquaculture s'est intensifiée pour représenter 96% de la production mondiale (soit seulement 4% par cueillette) en 2011 (Figure 18).



**Figure 18 : production halieutique mondiale en milliers de tonnes de plantes aquatiques par capture et aquaculture de 1950 à 2011 (FAO 2013)**

La culture d'algues s'est massivement développée pour faire face à une demande de plus en plus importante, à laquelle la cueillette ne pouvait plus répondre. La production mondiale d'algues provient à 99% de l'Asie.

D'après la Figure 19, les algues vertes sont très peu cultivées avec seulement 21 335 tonnes produites en 2011 (soit 0,12 %), tandis que les algues brunes sont cultivées à 41,14 % (7,15 millions de tonnes) et les plus cultivées sont les algues rouges avec 10,2 millions de tonnes produites en 2011 (soit 58,73 %). La production d'algues rouges s'est massivement développée depuis les années 2000 pour représenter 59% de la production mondiale et les algues brunes 41% en 2011.



**Figure 19 : production mondiale d'algues par aquaculture (tonnes eq. frais) de 1950 à 2011 (FAO 2013)**

Les principales espèces produites et leur principale utilisation sont présentées dans le Tableau IV. La Chine est le plus grand producteur avec 10,3 millions de tonnes en poids frais (61 %) en 2008. La part la plus importante de sa production correspond à l'algue alimentaire Kombu ou *Laminaria japonica* représentant près de 40% de sa production. L'Indonésie est le deuxième pays producteur, essentiellement d'algues pour la production de Produit Alimentaire Intermédiaire (PAI) avec 90 % d'*Euchema spp.* et 10 % de l'algue alimentaire *Gracilaria spp.* représentant ainsi plus de 2 millions de tonnes (12,8 %). Au 3<sup>ème</sup> rang, ce sont les Philippines avec près de 10 % de la production mondiale (1,7 millions de tonnes) produisant majoritairement l'algue *Euchema cottonii* (PAI) à 85 %. La République de Corée est le 4<sup>ème</sup> pays producteur avec un peu moins d'un million de tonnes d'algues fraîches produites en 2008. Elle produit essentiellement des algues alimentaires : du Wakame ou *Undaria pinnatifida* à 41 %, du Kombu ou *Laminaria japonica* à 30 % et du Nori ou *Porphyra sp.* à 24 %. La production Japonaise est de 560 100 tonnes en 2008 dont 60 % correspondent au Nori (8 % de Kombu et 9,8 % de Wakame). Le nori a une forte valeur ajoutée de 16 000 \$ US la tonne sèche, alors que le kombu n'est qu'à 2 800 \$ US la tonne sèche et le wakame a 6 900 \$ US la tonne sèche (FAO 2008).

**Tableau IV : production mondiale en volume des principales espèces d'algues consommées en 2011 (FAO 2013)**

Espèce	Nom scientifique	Utilisation dominante	Volume 2011 (par aquaculture)	
			Tonnes (eq. frais)	%
Laminaire du Japon	<i>Laminaria japonica</i>	Alimentation (légume)	5 318 630	30%
Euchema nca	<i>Eucheuma spp</i>	PAI ( <b>colloïdes</b> <sup>23</sup> )	4 623 754	26%
Mousse de la mer de Elkhorn (Elkhorn sea moss)	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	PAI (colloïdes)	2 100 146	12%
Wakame	<i>Undaria pinnatifida</i>	Alimentation (légume)	1 757 246	10%
Gracilaire verruqueuse	<i>Gracilaria verrucosa</i>	Alimentation (légume)	1 518 455	8%
Nori nca	<i>Porphyra spp</i>	Alimentation (légume)	1 027 491	6%
Algues gracilaires	<i>Gracilaria spp</i>	Alimentation (légume)	739 464	4%
Nori	<i>Porphyra tenera</i>	Alimentation (légume)	608 836	3%
Euchema épineuse	<i>Eucheuma denticulatum</i>	PAI (colloïdes)	265 962	1%
TOTAL			17 959 984	100%

NB : nca = non compris ailleurs (non compris dans une autre catégorie. Exemple : *Eucheuma denticulatum* présente un tonnage à elle seule, ainsi toutes les autres espèces d'*Eucheuma* ne présentant pas un tonnage seul suffisamment important, sont regroupés dans un ensemble sous *Eucheuma nca*).

### 3.1. Utilisation des algues en tant que légumes, condiments ou ingrédients pour l'alimentation humaine

Les trois plus gros producteurs d'algues alimentaires sont la Chine, la Corée du Sud et le Japon. Ce sont aussi bien des algues vertes, que des rouges ou des brunes mais ce ne sont pas des espèces uniques, souvent il s'agit d'un mélange de plusieurs espèces. Dans ces pays, la consommation d'algue dans l'alimentation est une pratique culturelle et une habitude alimentaire qui remonte à plusieurs siècles alors qu'en France l'utilisation des algues est une pratique marginale et date seulement des années 70. Cependant, depuis quelques années il existe une réelle volonté d'introduire les algues dans l'alimentation

<sup>23</sup> Substance liquide ou semi-solide contenant des particules en suspension de petite taille pour former une dispersion homogène soit un système biphasique. On parle de suspension colloïdale et non de solution.

humaine, mais cela reste difficile car malgré tout, elles demeurent considérées comme un aliment non traditionnel. Cependant il existe de plus en plus de livres de cuisine à base d'algues (exemples de recettes présentées en Annexe 6). De même avec la tendance actuelle du « manger BIO », d'aliments naturels issus d'environnements sains, les algues devraient susciter un intérêt de plus en plus important. Cependant, des critères de restriction d'utilisation existent, à savoir des teneurs maximales en métaux lourds (de 0,1 à 5 mg par kg sec de mercure, cadmium, arsenic minéral, plomb et étain) et en iode (2000 mg par kg sec) et des critères microbiologiques (de 1 à 10<sup>5</sup>/gramme) (avis du CSHPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France) (CEVA 2012).

À ce jour, en France, 24 espèces sont autorisées à la consommation (CEVA 2012). Elles sont présentées dans le Tableau V.

**Tableau V : algues autorisées à la consommation en France (CEVA 2012)**

Espèces	Nom commun	Espèces	Nom commun
<b>Algues Brunes</b>		<b>Algues Rouges</b>	
<i>Ascophyllum nodosum</i>		<i>Palmaria palmata</i>	Dulse
<i>Fucus vesiculosus</i>		<i>Porphyra umbilicalis</i>	Nori
<i>Fucus serratus</i>		<i>Porphyra tenera</i>	Nori
<i>Himanthalia elongata</i>	Spaghetti de mer	<i>Porphyra yezoensis</i>	Nori
<i>Undaria pinnatifida</i>	Wakame	<i>Porphyra dioica</i>	Nori
<i>Laminaria digitata</i>	Kombu	<i>Porphyra purpurea</i>	Nori
<i>Laminaria saccharina</i>	Kombu Royal	<i>Porphyra laciniata</i>	Nori
<i>Laminaria japonica</i>	Kombu	<i>Porphyra leucostica</i>	Nori
<i>Alaria esculenta</i>	Atlantic wakame	<i>Chondrus crispus</i>	Pioca, lichen
		<i>Gracilaria verrucosa</i>	Ogonori
		<i>Lithothamnium calcareum</i>	Mäerl
<b>Algues Vertes</b>		<b>Microalgues</b>	
<i>Ulva sp.</i>	Laitue de mer	<i>Spirulina sp.</i>	
<i>Enteromorpha sp.</i>	Aonori	<i>Odontella aurita</i>	
		<i>Chlorella sp.</i>	

En ce qui concerne la production d'algues, la France est le 10<sup>ème</sup> pays producteur mondial avec près de 71 000 tonnes (en 2011) soit moins de 1% de la production mondiale totale. Contrairement à l'échelle mondiale où l'aquaculture est à l'origine de 99% de la production, en France ce mode de production ne produit qu'une cinquantaine de tonnes par année. L'essentiel de la production est obtenu par récolte (navires goémoniers ou récoltants à pied).

Les laminaires représentent 96% de la production française et les 4% restants sont des **fuciales**<sup>24</sup>.

Au niveau de la consommation, la France se situe au 9<sup>ème</sup> rang mondial avec 180 000 tonnes équivalent frais consommées en 2011. Mais cette consommation est due à l'industrie des colloïdes présente en Bretagne. Dans ces 180 000 tonnes consommées, 71 000 proviennent de la production française et de l'import/export avec 125 000 tonnes importées (du Chili, des Philippines et de la Tanzanie) pour 20 000 tonnes exportées par an (à destination de l'Europe) (Breizh'alg 2012).

Les produits alimentaires distribués en France sont des algues fraîches salées ou non, des algues séchées (différentes formes), des marinades, des tartares, des produits aux algues (pâté, terrine...) (Figure 20).



**Figure 20 : exemples de produits alimentaires à base d'algues (Google images)**

*Porphyra sp.* est l'algue rouge la plus consommée au monde, sous forme séchée elle constitue le nori permettant entre autre la réalisation des makis (Figure 20 au centre). En 2011 la production s'élève à plus de 1,6 millions de tonnes équivalent frais représentant 1,13 millions de \$ US. Le kombu est l'algue brune dont la production est la plus importante avec une production mondiale de 5,2 millions de tonnes en 2011. En ce qui concerne le wakame, 1,17 millions de tonnes ont été produites en 2011 représentant près de 730 000 \$ US. Il entre dans la composition de la soupe miso (Figure 20 à droite).

---

<sup>24</sup> Ordre d'algues brunes de la classe des *Phaeophyceae*. Il comprend des macroalgues intertidales poussant en étant pour la plupart ancrées sur substrats durs tels que les espèces des genres *Fucus* et *Sargassum*.

## 3.2. Les molécules d'intérêt issues des algues

Certains composants d'algues, comme les polysaccharides (alginates : E400 à E405, carraghénanes : E407 et agars : E406) sont utilisés comme additifs depuis de nombreuses années. Cependant depuis quelques années, d'autres composants comme les lipides ou les caroténoïdes, sont devenus attrayant du fait de leurs effets bénéfiques potentiels sur la santé humaine. Le développement de nouvelles techniques d'extraction, de purification et de caractérisation de composés bioactifs permet une utilisation croissante de composés algaux.

### 3.2.1. Les phycocolloïdes

Le contenu en polysaccharides des algues est situé entre 33 et 75 % du poids sec, dont la majeure partie correspond à des fibres. Les phycocolloïdes les plus utilisés industriellement sont les alginates et les carraghénanes, pour leurs propriétés gélifiantes, épaississantes, texturantes et stabilisantes. Ils sont utilisés comme additifs dans les industries pharmaceutique, alimentaire, textile, peintures et vernis. Les propriétés gélifiantes et épaississantes sont deux **propriétés rhéologiques**<sup>25</sup> différentes. Elles sont le résultat de la formation de liaisons hydrogènes entre les macromolécules de polymères et les molécules d'eau. Ainsi, un gélifiant modifie la structure interne du liquide auquel il est additionné, à chaud ou à froid, aboutissant à une structure finale tridimensionnelle par **réticulation**<sup>26</sup>. Un épaississant est une substance qui va augmenter la viscosité du liquide auquel il est additionné.

#### 3.2.1.1. Les applications industrielles

##### 3.2.1.1.1. Alimentaire

Les alginates et les carraghénanes sont largement utilisés dans de nombreuses industries dont l'alimentaire, de par leur propriétés : capacité à former des gels, modifications de la viscosité, stabilisation de formulations aqueuses, de dispersions et d'émulsions. Ils sont utilisés dans des boissons (jus de fruits, café, cacao, thé, lait de soja, boissons alcoolisées), des produits laitiers (lait fermenté, boisson instantanée en poudre, yaourts, glaces), des desserts (gâteaux, sorbets), des produits à tartiner (confitures, gelées, miel), des confiseries (sucre, gâteaux, biscuits, chocolat, bonbons) et des produits de boulangerie (pain, pâtisseries) (Samaraweera *et al.* 2011).

---

<sup>25</sup> La rhéologie est la science qui étudie et décrit l'écoulement, la déformation et la rupture de corps sous l'effet d'une contrainte.

<sup>26</sup> Passage d'un polymère d'un état où les macromolécules sont indépendantes à un état où elles sont reliées par des liaisons chimiques.



Les alginates industriellement disponibles sont des mélanges d'acide alginique et de sels (sodium, potassium, ammonium) (Glicksman 1987). L'alginate est un composé largement présent dans la paroi cellulaire des algues brunes. Il est extrait de plusieurs types d'algues brunes comme *Ecklonia*, *Macrocystis*, *Undaria*, *Laminaria*, *Durvillea*, *Turbinaria* et *Sargassum* (Kaliaperumal 2003). Il est présent dans ces algues sous forme de sels de sodium, magnésium et calcium d'acide alginique. L'alginate est extrait sous forme d'alginate de sodium (Mc Hugh 2003). L'utilisation d'alginate en industrie alimentaire est basée sur sa capacité à augmenter la viscosité de solutions aqueuses et à former des gels qui ne fondent pas lorsqu'ils sont chauffés. Ceci les différencie des gels d'agar.

Les kappa-, lambda- et iota-carraghénanes sont les principaux carraghénanes commercialisés. Le kappa provient de l'algue *Kappaphycus alvarezii* et le iota provient de *Euchema denticulatum* (Bixler *et al.* 2001). Le kappa forme des gels solides et rigides tandis que le iota forme des gels élastiques. Le lambda-carraghénane n'a pas de propriétés gélifiantes et il réagit avec certaines protéines, comme la caséine, produisant des solutions très visqueuses (Glicksman 1987). Ainsi, les carraghénanes sont très utilisés dans la fabrication de produits laitiers comme agents viscosants et stabilisants (Bixler *et al.* 2001) et pour les mêmes propriétés dans le reste de l'industrie agroalimentaire.

Contrairement aux alginates et carraghénanes, l'agar n'est pas aussi largement utilisé dans l'industrie alimentaire (Sartal *et al.* 2011). Il est obtenu à partir des genres *Gracilaria* et *Gelidium*. Il est utilisé comme stabilisant et épaississant. Quelques applications en boulangerie, conserves de viandes et pâtisseries ont été rapportées (gâteaux, meringues, crèmes, pâtes de fruits) (Mc Hugh 2003).

#### 3.2.1.1.2. Cosmétique

L'industrie cosmétique utilise les polysaccharides pour les mêmes propriétés qu'en alimentaire, mais aussi pour d'autres propriétés : adoucissantes, filmogènes et hydratantes (Hernandez et Mercier-Fresnel 2006). Les polysaccharides permettent un maintien des propriétés texturantes du produit cosmétique (Kim 2011). Ils entrent dans la formulation de crèmes, lotions, baume à lèvres, eye liner, mascara, shampooings, crèmes et masques capillaires mais aussi dans des dentifrices.

*Exemple de produit cosmétique contenant des alginates :*

Manugel® DMB (alginate de sodium), gel hydroalcoolique (traitement hygiénique et désinfection des mains) (Bender et Pellikaan 2011).



Plusieurs applications cosmétiques existent pour les carraghénanes, utilisés comme agents de texture sous les noms de Satiagum® (Potter *et al.* 2013) ou encore Aubigum® (Ambrosini *et al.* 1998).

#### 3.2.1.1.3. Autres applications

Enrobages alimentaires comestibles : les emballages synthétiques alimentaires sont non dégradables et induisent une pollution importante de l'environnement. Ainsi des emballages alimentaires comestibles ou biodégradables permettent de réduire cette pollution. De plus ils augmentent la durée de vie du produit. Ils sont mis au point à partir d'hydrocolloïdes (alginates et carraghénanes), de lipides ou de protéines et forment une fine couche à la surface du produit (González-Aguilar *et al.* 2010; Cian *et al.* 2014).

Applications biomédicales : les alginates sont utilisés dans la fabrication de matériel de modelage dentaire (Samaraweera *et al.* 2011).

Microbiologie : l'agar entre dans la composition des milieux de culture (Samaraweera *et al.* 2011).

Biologie moléculaire : l'agarose, obtenue à partir de l'agar, est largement utilisée en biologie moléculaire en entrant dans la composition des gels d'électrophorèse (Samaraweera *et al.* 2011).

Industrie textile : les alginates sont utilisés comme épaississants pour former des pâtes contenant les colorants (Mc Hugh 2003).

Alimentation animale : les alginates sont utilisés comme agent de liaison dans les aliments élaborés pour la culture de poissons et dans l'élaboration d'aliments pour animaux (Mc Hugh 2003).

#### 3.2.1.2. La santé humaine

Les polysaccharides sont qualifiés de fibres alimentaires dont la définition a été discutée de nombreuses fois selon les méthodes de dosages utilisées. À l'origine, elles correspondent aux restes du squelette des cellules végétales présents dans l'alimentation qui résistent à l'hydrolyse par les enzymes digestives humaines. La définition la plus récente définit les fibres alimentaires comme les fibres alimentaires totales incluant à la fois les fractions solubles et insolubles qui sont mesurées après hydrolyse enzymatique par les enzymes  $\alpha$ -amylase, protéase et amyloglucosidase (Kim 2011).

Les fibres alimentaires ne constituent pas une source d'énergie en nutrition humaine et ne peuvent donc pas être incluses dans les facteurs nutritionnels. Cependant, les fibres alimentaires totales (solubles et insolubles) semblent avoir de nombreux effets positifs sur la santé humaine. Les fibres solubles semblent constituer un facteur dans la prévention de l'obésité et de maladies graves comme des maladies cardiovasculaires et des cancers comme le cancer colorectal (Harris et Ferguson 1993; Kim *et al.* 2010a; Kim *et al.* 2010b). Une étude a montré que certains polysaccharides comme les acides alginiques et les carraghénanes sont capables de réduire l'absorption du cholestérol dans l'intestin (Jiménez-Escrig et Sanchez-Muniz 2000). Une autre équipe a mis en évidence l'utilisation possible de polysaccharides algaux en tant qu'agents thérapeutiques en réduisant la sévérité du diabète de Type I par une inhibition de l'activité de l'amyloglucosidase (Cho *et al.* 2011). Des polysaccharides sulfatés isolés de macroalgues présentent une activité anti-VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Vo *et al.* 2011).

### 3.2.2. Les lipides

Les lipides sont présents en très faible quantité dans les algues (0,9-5,2 % de matière sèche) (Misurcova 2011). Cependant, la plupart d'entre eux sont des acides gras polyinsaturés  $\omega 3$  et  $\omega 6$  qui ont des effets positifs en diminuant les risques des maladies cardiovasculaires, de l'ostéoporose et du diabète (effets anti-inflammatoires et anticancéreux) ou encore de l'arthrite et de l'hypertension (Bao *et al.* 1998; Horrocks et Yeo 1999; Grimm *et al.* 2002; Hu *et al.* 2002; Hu *et al.* 2003; Maeda *et al.* 2008). Des huiles de végétaux marins sont produites dans le but de produire des aliments enrichis en acides gras polyinsaturés  $\omega 3$  type EPA et DHA (Rymer *et al.* 2010; Díaz *et al.* 2011).

### 3.2.3. Les pigments algaux

Les substances colorantes sont très importantes dans les industries de l'agroalimentaire et de la cosmétique. Elles permettent d'identifier les produits, d'en évaluer la qualité, de remédier à la perte de couleur et jouent également un rôle psychologique sur le consommateur. Ces industries utilisent des colorants afin d'augmenter l'acceptation du produit par les consommateurs mais aussi pour palier à une perte de coloration du produit après le processus industriel de fabrication. L'utilisation des colorants n'est pas récente puisqu'elle remonte à l'Antiquité. Exclusivement d'origine naturelle, ils étaient destinés au maquillage. Les composés synthétiques sont apparus dans la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle afin de remplacer les colorants d'origine naturelle qui s'avéraient trop coûteux et car ils présentent des caractéristiques physicochimiques et économiques plus intéressantes. Mais de nos jours, les colorants naturels deviennent de plus en plus convoités à cause de

l'augmentation de la demande des consommateurs, par la mode du naturel, mais également par une diminution de la liste des colorants synthétiques autorisés. En effet, ces derniers souhaitent de plus en plus l'utilisation de produits naturels, fonctionnels et sains (Batista *et al.* 2006). L'un des problèmes quant à l'utilisation de colorants naturels dans l'industrie agroalimentaire, est leur faible stabilité sous différentes conditions de température, lumière ou pH après leur extraction (Hendry et Houghton 1996; Wissgott et Bortlik 1996). Ainsi il est nécessaire de développer des méthodes pour palier à la difficulté à stabiliser les colorants par des méthodes naturelles et au faible nombre de colorants naturels commercialisés. La plupart des colorants algaux utilisés en alimentaire proviennent de microalgues comme les espèces *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella* et *Haematococcus* (Borowitzka 1997).

Les industriels sont donc à la recherche de nouveaux produits en visant les trois objectifs suivants :

- améliorer la stabilité des colorants connus vis-à-vis du pH, de la lumière, de la température ou de l'oxydation ;
- identifier de nouveaux pigments d'intérêt industriel ;
- mettre au point de nouveaux procédés de production pour les pigments déjà utilisés, par biotechnologie à partir de microalgues, champignons ou bactéries ou encore par digestion enzymatique.

#### 3.2.3.1. Chlorophylles

Les chlorophylles *a* et *b* sont employées dans l'industrie agro-alimentaire comme additifs (E140) en tant que colorant vert mais également pour leurs effets sur la santé humaine. En effet elles induisent une augmentation de l'hémoglobine dans le sang, elles ont également un effet sur la réparation cellulaire et elles améliorent la croissance cellulaire (Harun *et al.* 2010). Elles sont par exemple utilisées dans des confitures, gelées, sucreries, et des glaces (Chattopadhyay *et al.* 2008). La chlorophylle est un colorant liposoluble qui est peu stable à la chaleur et à la lumière ce qui limite son utilisation. Des dérivés chlorophylliens ont été obtenus et sont hydrosolubles et plus stables (E140, E141).

#### 3.2.3.2. Caroténoïdes

Ils sont principalement utilisés dans la formulation de produits de l'agro-alimentaire en tant que colorants (jaune, orange ou rouge) mais aussi pour leurs activités biologiques, notamment pour leur propriété antioxydante. Ils sont en général liposolubles. Plus de 400 structures différentes ont été identifiées. Ils sont constitués de deux groupes, les carotènes et les xanthophylles. Parmi les xanthophylles, la lutéine, la zéaxanthine, la canthaxanthine ou l'astaxanthine sont utilisés comme colorants dans l'industrie alimentaire (Becker 1994; Perez-Garcia *et al.* 2011).

Tableau VI : propriétés, couleur, origine et utilisations des caroténoïdes

Nom	N°	Couleur	Effets/Rôles	Produits dans lesquels ils sont présents	Origine
$\beta$ -carotène	E160a	orange-jaune	Effets bénéfiques sur la santé humaine ; source de rétinol ou de provitamine A (Oren 2005)	Beurre, margarine, fromage, jus de fruits, produits de boulangerie, produits laitiers, pâtisseries (Dufossé <i>et al.</i> 2005)	Synthétique pour la quasi-totalité ; Carotte et microalgue <i>Dunaliella salina</i>
astaxanthine	E161j	rose -orange	Nutrition animale Nutrition humaine : colorant alimentaire. Propriétés bénéfiques sur la santé : protection contre les maladies neurodégénératives, l'inflammation et le cancer (Guerin <i>et al.</i> 2003). Antioxydant puissant	Complément alimentaire dans l'élevage des saumons	Microalgue <i>Haematococcus pluvialis</i> (Guerin <i>et al.</i> 2003)
canthaxanthine	E161g	orange ou rouge	Colorant alimentaire (intensifier la coloration des jaunes d'œufs) pour l'alimentation animale et humaine ; agent bronzant	Produits laitiers, pâtisseries, boissons, bière et vin	Synthétique Présent dans les giroles et les plumes de flamants roses
Lutéine et Zéaxanthine (= isomères)	E161b E161h	jaune à rouge-orangé	Colorant alimentaire pour l'alimentation animale et humaine ; effets protecteurs sur la cataracte et la dégénérescence de la rétine ; améliore la tolérance au soleil (améliore la protection contre les UV, et aux brûlures)	Alimentation du poulet pour colorer la peau et le jaune d'œuf (Perez-Garcia <i>et al.</i> 2011) ; jus de fruits, épinards	Œillet d'Indes ( <i>Tagetes erecta</i> )

De plus ils ont des propriétés bénéfiques dans la prévention de nombreuses maladies comme les problèmes cardiovasculaires, les cancers et autres maladies chroniques. Cet effet bénéfique serait dû à leur rôle antioxydant basé sur leurs propriétés d'inactivation des oxygènes singulet et leur capacité à piéger les radicaux libres (Stahl et Sies 1996). Une étude sur *Sargassum siliquastrum* a montré que la fucoxanthine inhibe la formation des espèces réactives oxygénées (ROS, Reactive Oxygen Species en anglais) et inhibe les dommages de l'ADN et l'apoptose induite par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Heo *et al.* 2008). Une autre étude a montré que l'astaxanthine induisait une inhibition de la formation de radicaux libres due à la peroxydation des lipides dans le foie de rat (Palozza et Krinsky 1992). Ainsi la fucoxanthine et l'astaxanthine constituent une source possible d'antioxydants et d'ingrédients naturels utilisables dans les produits alimentaires médicaments (alicaments) pour la prévention et le contrôle du stress oxydatif.

### 3.2.3.3. Phycobiliprotéines

Ces pigments offrent des perspectives industrielles potentiellement intéressantes. Outre leurs propriétés en fluorescence responsables de leur utilisation en immunofluorescence sous leur forme la plus purifiée, ces composés suscitent un intérêt pour les secteurs de l'agroalimentaire et de la cosmétique comme colorants naturels.

#### 3.2.3.3.1. Colorant

La phycocyanine est actuellement utilisée comme colorant bleu dans l'industrie alimentaire. Elle est commercialisée sous le nom de Lina Blue (Dainippon Ink & Chemicals, Sakura) pour la fabrication de chewing-gums, sorbets, bâtons glacés, sucreries, boissons non alcoolisées, wasabi et produits laitiers (Spolaore *et al.* 2006). Des études de stabilité ont montré que la nuance de bleu produite par l'algue rouge *Porphyridium aeruginosum* ne change pas avec le pH. La couleur est stable à la lumière mais sensible à la chaleur. Cependant la couleur est très stable dans des préparations sèches (des décorations en sucre pour pâtisseries maintiennent leur couleur après des années de stockage) (Sekar et Chandramohan 2008).

La B-phycoérythrine et la b-phycoérythrine extraites de *Porphyridium cruentum* sont utilisées comme colorants rosâtre-rouge en alimentaire (desserts à base de gélatine et produits laitiers). La R-PE de *Porphyra* est également utilisée comme colorant (Dufossé *et al.* 2005). Il existe un grand nombre de brevets pour l'utilisation de la phycoérythrine comme colorant alimentaire. Cependant son utilisation comme colorant n'est pas encore approuvée en France à ce jour dans les industries cosmétique et alimentaire (Dufossé *et al.* 2005).

En plus des propriétés de coloration, la phycoérythrine possède une fluorescence jaune. Cette propriété est intéressante pour la conception de produits alimentaires originaux. Des sucettes transparentes, des décorations en sucre pour pâtisserie, des boissons gazeuses et des boissons alcoolisées ont été élaborées avec la phycoérythrine pour créer des produits fluorescents. Cependant la durée de vie de ce genre de produit est courte (Dufossé *et al.* 2005; Sekar et Chandramohan 2008).

#### 3.2.3.3.2. Marqueur fluorescent

La phycoérythrine est dotée d'un coefficient d'extinction molaire exceptionnellement élevé ( $\epsilon = 2.10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  pour 240 000 Dalton) et d'un rendement de fluorescence au moins dix fois supérieur à ceux observés pour les fluorochromes traditionnels (Yu *et al.* 1981; Kronick 1986). De plus, elle émet dans l'orange où le bruit de fond en fluorescence est plus faible qu'à d'autres longueurs d'ondes. Ces propriétés de fluorescence sont largement utilisées dans de nombreuses autres applications particulièrement en cytométrie de flux. Les phycoérythrines possèdent de nombreux avantages qui ont conduit leur utilisation dominante comme fluorochromes (Kronick 1986). Des études sur la synthèse de phycobiliprotéines couplées à des molécules à activité spécifique (immunoglobulines, protéine A, biotine, avidine) ont montré que ces couplages sont d'excellents agents pour le tri de cellules activées par fluorescence (FACS) (Oi *et al.* 1982). Une autre étude a montré que des dérivés de phycobiliprotéines de faible masse moléculaire sont applicables pour des analyses immunologiques par cytométrie de flux et également pour la détection intracellulaire d'antigènes (Telford *et al.* 2001). La phycoérythrine est un composé important pour la protéomique et la génomique et constitue la base des puces à ADN (De Rosa *et al.* 2003).

#### 3.2.3.3.3. Bioactivité

De même que les caroténoïdes (Ngo *et al.* 2011), les phycobiliprotéines ont des propriétés antioxydantes, immunomodulatrices, neuroprotectrices, anticancéreuses, hépatoprotectrices et anti-inflammatoires (Plaza *et al.* 2008; Sekar et Chandramohan 2008).

La phycocyanine a été rapportée comme présentant de nombreuses propriétés pharmaceutiques. Des effets antioxydant, anti-inflammatoires, neuroprotecteurs et hépatoprotecteurs ont été expérimentalement attribués à la phycocyanine (Romay *et al.* 2003; Gupta et Gupta 2012). De plus, une étude a rapporté l'effet inhibiteur de la phycocyanine extraite de *Spirulina platensis* sur la croissance de cellules de leucémie humaine K562 (Liu *et al.* 2000). Une étude a rapporté l'effet inhibiteur de croissance de l'allophycocyanine sur l'entérovirus 71 (Shih *et al.* 2003). Il a été montré également que les

sous-unités de R-PE constituent une alternative intéressante pour augmenter la sélectivité de la photochimiothérapie dans le traitement des cancers (Bei *et al.* 2002).

### 3.3. Autres utilisations des macroalgues

De nos jours, les algues non comestibles peuvent constituer une ressource de composés bioactifs intéressante pour la formulation de fertilisants ou encore d'aliments pour la filière animale (Takashi et Takahiko 2009). Leur utilisation est en cohérence avec le concept de l'agriculture verte (Castlehouse *et al.* 2003).

#### 3.3.1. Utilisation des algues en tant fertilisants pour l'agriculture

L'utilisation de fertilisants classiques en excès induit de lourds problèmes environnementaux (Kawashima *et al.* 1997). Une solution durable à ce problème pourrait être l'utilisation de fertilisants élaborés à base d'algues. Les fertilisants peuvent correspondre à des algues fraîches, hachées, séchées, ou broyées en farines d'algues (algues brunes) (Bateman et Kelly 2007). Elles peuvent être appliquées directement sur les sols et laissées compostées ou appliquées indirectement lorsqu'elles sont séchées et broyées (Lee 2008). Avec leur forte teneur en fibres, les algues aident à maintenir l'humidité, alors que les minéraux constituent une source d'oligoéléments. D'autres méthodes de fertilisation par les algues ont été mises au point à partir d'extraits d'algues obtenus par hydrolyse d'algues macérées à froid ou en conditions alcalines en chambre pressurisée (Bateman et Kelly 2007). Des produits biostimulants pour les plantes sont également élaborés à partir d'algues. Sur le marché, plusieurs fertilisants concentrés développés à base d'algues sont disponibles (Chojnacka 2011). Dans l'hémisphère Nord, les algues utilisées sont essentiellement *Ascophyllum nodosum*, *Fucus sp.*, *Sargassum sp.* et *Laminaria sp.* et dans l'hémisphère Sud ce sont les genres *Ecklonia* et *Durvillea* (Bateman et Kelly 2007; Lee 2008).

#### 3.3.2. Utilisation des algues pour l'alimentation animale

En ce qui concerne l'utilisation des algues comme aliments pour animaux, les applications commerciales sont plus rares (Lee 2008). Elles représentent tout de même une alternative pour l'alimentation animale car elles constituent une source de composés biologiquement actifs. Elles peuvent donc être employées comme compléments alimentaires (Taboada *et al.* 2010). Utilisées comme additif pour l'alimentation animale, les farines d'algues ont d'abord été fabriquées en Norvège dans les années 60. Elles sont obtenues à partir d'algues brunes qui sont séchées et moulues. Les macroalgues sont également employées dans des aliments pour animaux domestiques comme substituts d'ingrédients animaux (pigments) (Cruz-Suarez *et al.* 2009; Craigie 2011). Elles s'avèrent intéressantes dans le régime des



ruminants (moutons et chèvres) (Hansen *et al.* 2003). De même, pour les animaux aquatiques, ils peuvent être nourris avec des algues fraîches ou transformées, cependant cette utilisation est moins développée que pour les animaux terrestres (Fleurence *et al.* 2012). Quelques exemples existent cependant. C'est le cas du loup de mer (le bar), les poissons carnivores têtes-de-serpent de la famille des *Channidae*, et les crevettes (Cruz-Suarez *et al.* 2009). D'autres études font état de l'utilisation de macroalgues telles que *Palmaria mollis*, *Hypnea spinella* ou *Ulva sp.* comme aliments pour les ormeaux (Rosen *et al.* 2000; Demetropoulos et Langdon 2004; Viera *et al.* 2005; Chojnacka 2011). Elles peuvent être aussi consommées en tant que nutraceutiques pour animaux par la diversité de propriétés des molécules qu'elles synthétisent (antibiotiques, antioxydantes, antitumorales, antivirales, ...) (Chojnacka 2011). Les algues peuvent également être utilisées indirectement en aquaculture en traitant les déchets générés par cette activité (Fleurence *et al.* 2012).

### 3.3.3. Autres actifs algaux utilisés en cosmétique :

L'iode est présent en forte concentration dans les algues, comme dans les Laminaires. Il stimule les hormones thyroïdiennes T3, qui stimulent la lipolyse. Il est donc utilisé comme agent amincissant (crème amincissante au fucus : gel minceur thermoactif, Algotherm). Il existe aussi des agents antiacnéens, comme les oligosaccharides d'*Ascophyllum nodosum* et le zinc qui ont une action séborégulatrice, antibactérienne et anti-inflammatoire (Phycosaccharide antiacné®, CODIF). Les algues calcaires, *Lithothamnium calcareum* (maërl), riches en minéraux (95%) et carbonate de calcium permettent également la formulation de produits de gommage mécanique. L'alginate ou le carraghénane peuvent améliorer les qualités hydratantes du produit. En thalassothérapie, des pâtes d'algues, obtenues par broyage ou écrasement à froid, sont appliquées sur le corps, puis réchauffés par rayonnement infrarouge. Ce traitement, allant de pair avec une hydrothérapie utilisant l'eau de mer, est réputé pour apporter un soulagement en matière de rhumatismes et d'ostéoporose.



## 4. Présentation du modèle d'étude *Grateloupia turuturu*

*Grateloupia turuturu* appelée communément grateloupe est une Rhodophycée que l'on rencontre dans quasiment toutes les eaux du globe. Introduite en Europe accidentellement au début des années 1970 suite à l'importation de naissains d'huître du Japon elle s'est ensuite répandue sur les côtes européennes.

### 4.1. Systématique et description

#### 4.1.1. Systématique

*Grateloupia turuturu* est une algue rouge pluricellulaire marine dont la taxonomie est la suivante :

Phylum : Rhodophyceae/Rhodophyta

Sous phylum : Eurhodophytina

Classe : Florideophyceae

Sous classe : Rhodymeniophycidae

Ordre : Halymeniales

Famille : *Halymeniaceae*

Genre : *Grateloupia*

Espèce : *Grateloupia turuturu* (Yamada 1941)



Figure 21 : spécimen de *Grateloupia turuturu* Yamada

À l'origine, la classification du genre *Grateloupia* était basée sur les caractères morphologiques induisant de nombreuses confusions pour plusieurs espèces. Ainsi dès le début des années 1970, *Grateloupia doryphora* est devenue l'exemple le plus connu des espèces d'algues introduites/invasives. Elle a été signalée comme nouvellement introduite sur la côte Atlantique en 1973 (Farnham et Irvine 1973) et en Méditerranée en 1982 (De Masi et Gargiulo 1982). À partir de là, plusieurs études ont rapporté la présence de *G. doryphora* sur la côte Atlantique (Villalard-Bohnsack et Harlin 1997; Marston et Villalard-Bohnsack 2002). Mais le développement de la systématique moléculaire a remis en question la taxonomie du genre *Grateloupia*. En effet, en analysant la séquence du gène *rbcL*, Gavio et Fredericq en 2002 ont démontré que l'algue invasive appelée *G. doryphora* était en fait *G. turuturu* Yamada, originaire de l'océan Pacifique. La première étude faisant référence à *Grateloupia turuturu* date de 1941, et elle a été réalisée par Yamada qui a donc donné son nom à l'espèce (Yamada 1941). Ainsi *G. turuturu* est une algue exotique introduite sur nos côtes après l'importation de l'huître japonaise *Crassostrea gigas* dans les années 1980 au

niveau de l'étang de Thau (Farnham 1980; Riouall *et al.* 1985). Elle a ensuite été identifiée en Bretagne (Cabioch *et al.* 1997). Elle s'est massivement développée en 2000 suite à la marée noire de l'Erika provoquant une disparition de ses prédateurs (Barillé-Boyer *et al.* 2004). En 2007, Figueroa *et al.* ont comparé *G. lanceola* et *G. turuturu* de différentes latitudes par différenciation morphologique, par analyse des séquences rbcL mais aussi en comparant la composition en mycosporine-like amino acids et ont confirmé que *G. turuturu* présente sur les côtes Bretonnes est bien native du Japon.

Aujourd'hui sa distribution (Figure 22) s'étend en Europe : Grande-Bretagne, France (Bretagne et Méditerranée) (Gavio et Fredericq 2002; Plouguerné *et al.* 2006; Lafontaine *et al.* 2011), Pays-Bas, Espagne (Barbara et Cremades 2004; Barreiro *et al.* 2006), Italie (Wilkes *et al.* 2006), Portugal (Araújo *et al.* 2011); mais aussi dans le reste du monde : Chine (Shao *et al.* 2004; Pang *et al.* 2006; Yang *et al.* 2010; Wang *et al.* 2012), Japon (Gavio et Fredericq 2002), Russie, Australie (Saunders et Withall 2006), Nouvelle-Zélande (D'Archino *et al.* 2007), Etats-Unis (Villalard-Bohnsack et Harlin 1992; Villalard-Bohnsack et Harlin 1997; Villalard-Bohnsack et Harlin 2001; Mathieson *et al.* 2008; Janiak 2009; Janiak et Whitlatch 2012), Mauritanie, Sénégal, Libéria, Côte d'Ivoire, Ghana, Angola et Namibie.

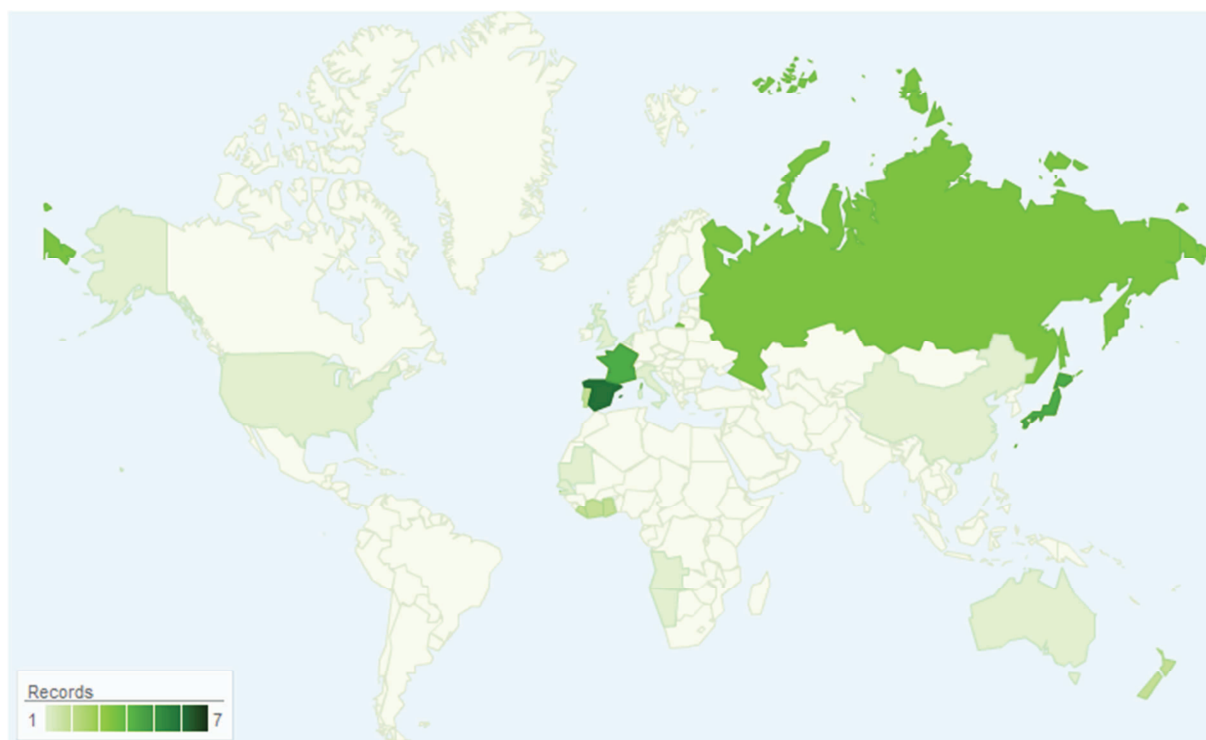


Figure 22 : distribution de *Grateloupia turuturu* par pays (Guiry 2013)

#### 4.1.2. Description

*Grateloupia turuturu* est une algue **foliacée**<sup>27</sup>, gélatineuse et muqueuse très polymorphe. Elle est fixée par un disque basal. Le thalle est constitué de deux à trois grandes frondes épaisses, fortement ondulées et de contour **lancéolé**<sup>28</sup>, se dressant à partir d'un stipe court et un **crampon**<sup>29</sup> réduit. Elle est de couleur rouge foncé à brunâtre. C'est une algue de grande taille, plus grande algue rouge d'Europe (Simon *et al.* 2001), allant jusqu'à 40 à 50 cm (Denis *et al.* 2010) pouvant dépasser les 1 m (rarement observé sur nos côtes, cependant un spécimen de 1,16 m a été prélevé le 24/05/13 à Batz-sur-Mer) et de quelques centimètres (Denis *et al.* 2010) à une dizaine de centimètres de large. Son épaisseur varie de 0,1 (Barbara et Cremades 2004) à 1 mm (Cabioc'h *et al.* 2006).

#### 4.2. Ecologie et reproduction

Elle se développe dans la zone de balancement des marées (intertidal haut) jusqu'au niveau moyen des basses mers de vive eau. Elle colonise principalement des cuvettes où l'eau subsiste à marée basse, aussi bien en modes battus et abrités. Elle se fixe à différents types de substrats solides tels que des rochers, des cailloux, ou encore des coquillages (moules). C'est une algue **euryhaline**<sup>30</sup> et **eurytherme**<sup>31</sup>.

Elle se reproduit par voie sexuée avec libération de spores et gamètes lors de la phase de reproduction. Spécificité des algues rouges, le cycle sexuel (Figure 23) est constitué de trois générations : le gamétophyte qui correspond aux longs thalles, produisant les gamètes mâles ou femelles ; le carposporophyte qui est microscopique et fixé au gamétophyte, produisant les carpospores ; et enfin le tétrasporophyte sous forme de thalle, produisant les tétraspores.

---

<sup>27</sup> En forme de feuilles.

<sup>28</sup> En forme de fer de lance.

<sup>29</sup> Organe de fixation de certaines algues.

<sup>30</sup> Organisme supportant des variations de salinité importantes du milieu aquatique où il vit (s'oppose à sténohalin).

<sup>31</sup> Organisme capable de supporter de grandes variations de température (s'oppose à sténotherme).

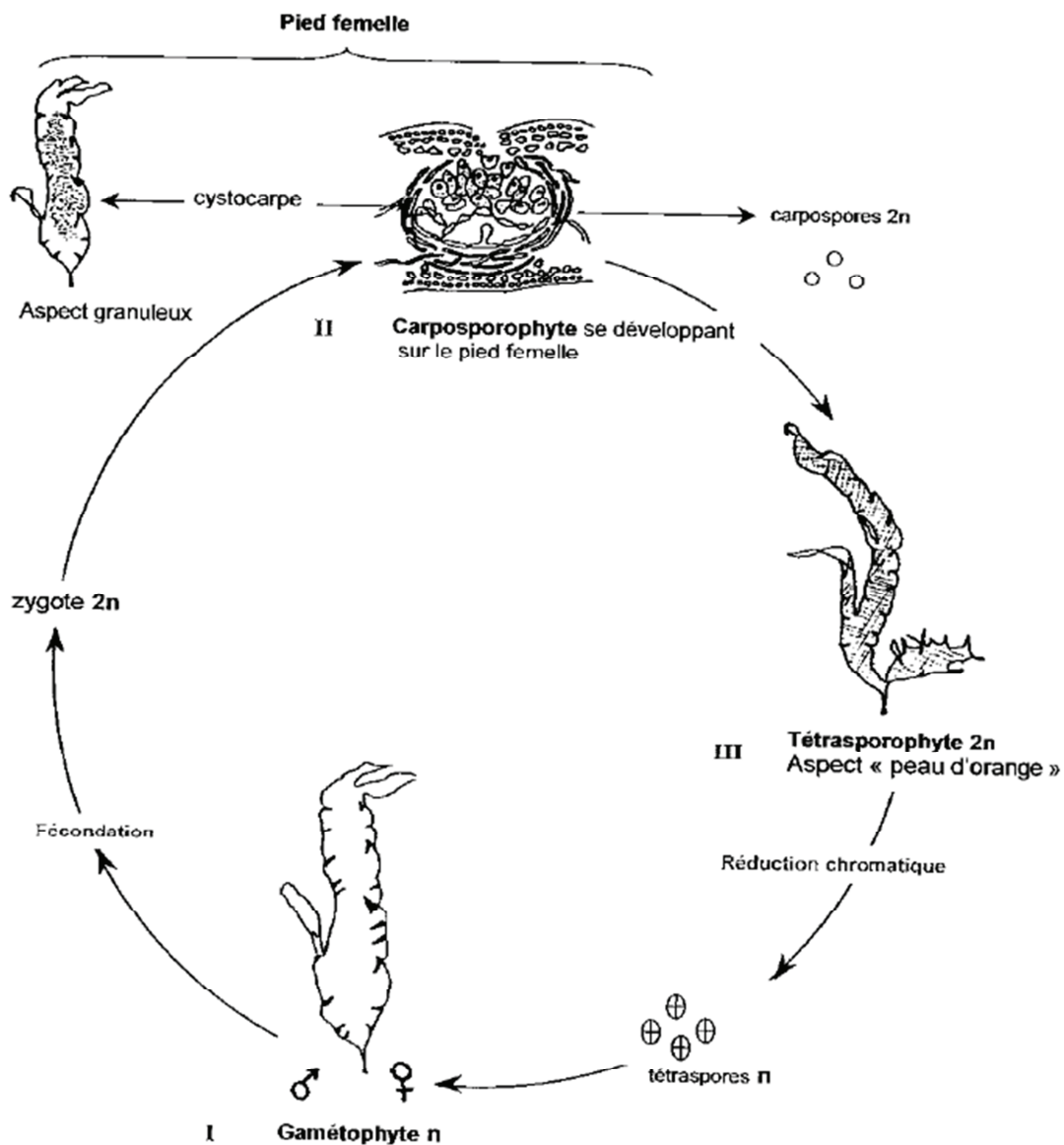


Figure 23 : cycle de reproduction de *Grateloupia turuturu* (Simon-Colin 2001)

### 4.3. Caractérisation biochimique

Les travaux réalisés par Claire Denis au sein du laboratoire MMS de 2006 à 2009 (Denis 2009), avaient pour objectif de caractériser biochimiquement *G. turuturu* et ainsi d'évaluer ses potentialités de valorisation au travers de l'extraction par hydrolyse enzymatique et de la purification de la R-PE. Elle a également étudié les variations saisonnières de l'algue au niveau biochimique.

**Tableau VII : composition biochimique de *Grateloupia turuturu* (Denis *et al.* 2010)**

	Teneur (% MS)
Lipides totaux	2,6 (dont 52% d'acide palmitique et 12% d'acide eicosapentaénoïque)
Fibres alimentaires	60 (dont 48% solubles et 12% insolubles)
Protéines	23
R-PE	0,30
R-PC	0,033
Cendres	18

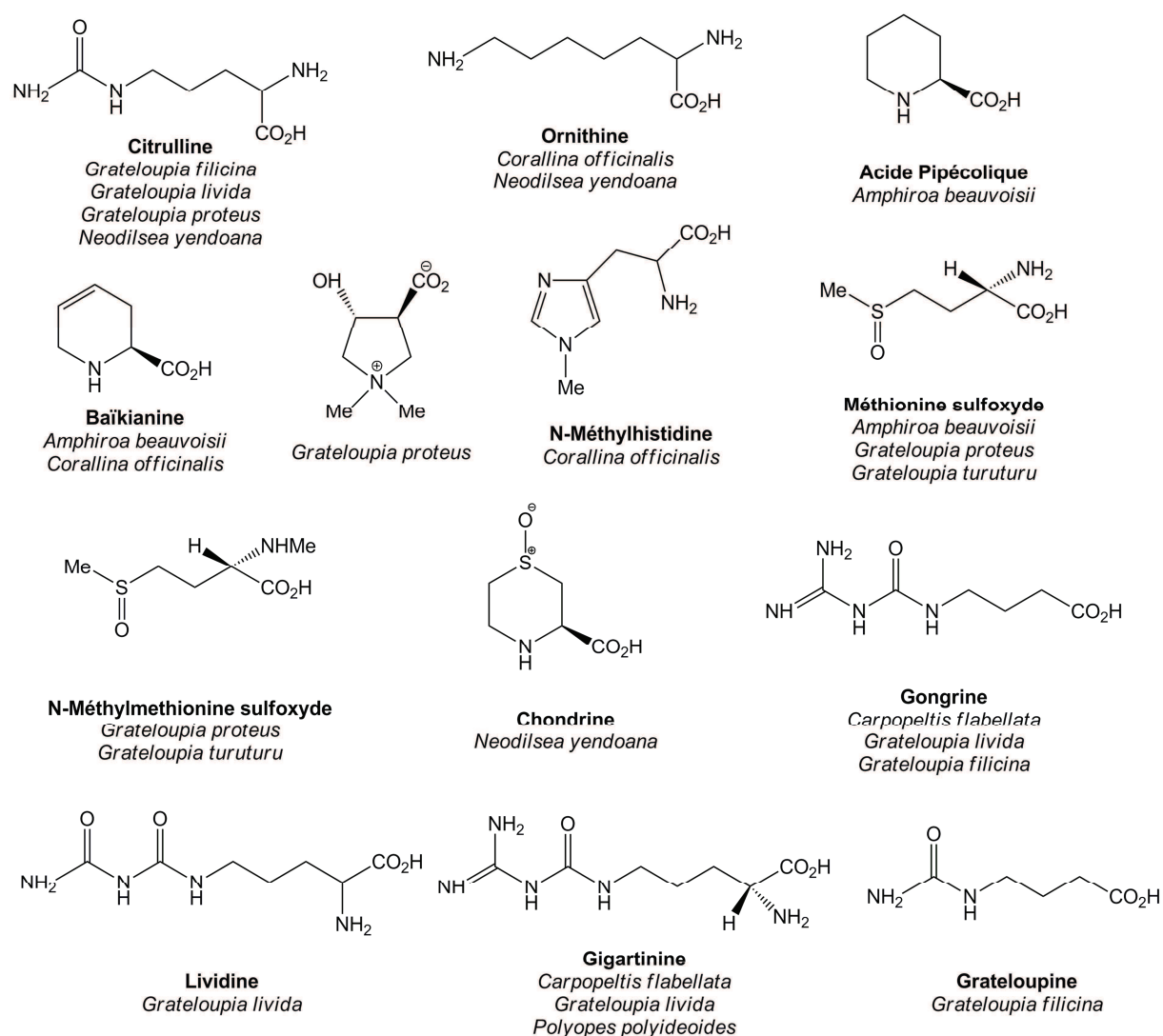
NB : MS = Matière Sèche

La composition biochimique de *G. turuturu* présente sur la façade Atlantique est présentée dans le Tableau VII. Sa teneur en lipides est faible, et l'acide palmitique représente plus de 50% des lipides totaux. La teneur en protéines est de 23% MS, ce qui est en concordance avec celle estimée à 20% MS par Fujiwara-Arasaki *et al.* (1984).

Au niveau des variations saisonnières, *G. turuturu* ne présente pas les mêmes caractéristiques selon le mois de l'année. Des variations sont observées sur le plan biochimique au niveau de la teneur protéique (14-27,5% MS) mais aussi sur le plan biologique au niveau de la taille (variations surtout en longueur). Ainsi la teneur en R-PE varie tout au long de l'année et dans un objectif de valorisation de la R-PE, la meilleure période de récolte s'étend de la fin de l'hiver au début du printemps (teneur maximale de 0,5% MS de R-PE en Janvier) (Denis *et al.* 2010).

En ce qui concerne les métabolites secondaires, bien que l'ordre des Halyméniales (anciennement les Cryptonémiales) soit un des ordres les plus riches avec une dizaine de familles et une centaine de genres, il figure parmi les moins étudiés (Kornprobst 2005). Cependant, une série de monoterpènes halogénés atypiques pour le genre *Ochtodes* ont été identifiés (Barahona et Rorrer 2003). De nombreuses études se sont intéressées aux

métabolites secondaires du genre *Grateloupia*, permettant alors d'accroître les connaissances sur la caractérisation biochimique de ce genre et plus particulièrement de l'espèce *Grateloupia turuturu*. Des molécules isolées à partir de l'ordre des Halyméniales, sont présentées dans la Figure 24. Il est intéressant de constater que parmi ces molécules isolées, plusieurs d'entre-elles proviennent du genre *Grateloupia*. C'est le cas notamment de la citrulline qui possède des propriétés antioxydantes, de marqueur de la fonction intestinale, d'agent hypoammonémiant (cycle de l'urée) et de modulateur du métabolisme du monoxyde d'azote (Schwedhelm *et al.* 2008).



**Figure 24: acides aminés non protéiques, uréido-aminoacides, et bêtaines des Cryptonemiales (= Halyméniales) (Kornprobst 2005)**

Diverses études sur *Grateloupia turuturu* ont pu mettre en évidence la présence d'acide iséthionique et de floridoside (Hellio *et al.* 2004), de L-citrullinyl-L-arginine (Miyazawa et Ito 1974a) et de L-méthionine-L-sulfoxyde et de N-méthylmethionine sulfoxyde (Miyazawa et Ito



1974b). De plus en 2006, une étude a permis d'isoler un stérol, le cholest-5-en-3-ol formate de *G. turuturu* (Plouguerné *et al.* 2006). En 2008, une équipe chinoise est parvenue à isoler onze composés de *G. turuturu* par des techniques chromatographiques et à les caractériser par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (Li *et al.* 2008). Plus récemment, une étude est parvenue à isoler plusieurs sesquiterpénoïdes et du cholestérol de *G. turuturu* (Yang *et al.* 2010).

#### 4.4. Valorisation de *Grateloupia turuturu*

Les espèces du genre *Grateloupia* sont consommées par l'Homme en tant qu'aliments (Figure 25) dans certains pays d'Asie mais constituent également une source de carraghénanes. Ainsi elles possèdent une valeur commerciale. Elles peuvent également être intégrées dans l'aquaculture et jouer le rôle de biofiltres (Fujiwara-Arasaki *et al.* 1984; Wong et Chang 2000; Pang *et al.* 2006). Elles constituent donc une source de fibres, de protéines, et de pigment au travers de la R-PE (Denis 2009), pouvant ainsi être valorisés dans les domaines de la pharmaceutique, de l'alimentaire et de la cosmétique.



Figure 25 : produit alimentaire à base de *Grateloupia spp* commercialisé sous le nom de Qingzheng et disponible sur internet (Weihai Qingzheng Foods Co)

Elles synthétisent également des composés bioactifs, de haute valeur ajoutée pour le secteur de la pharmacie : activité antivirale de certains polysaccharides de *Grateloupia indica* contre le Herpes Simplex Virus (HSV) (Chattopadhyay *et al.* 2007) ; activité antivirale de polysaccharides de *Grateloupia longifolia* et *Grateloupia filicina* contre le HIV (Wang *et al.* 2007) ; activité antivirale d'extraits méthanoliques de *Grateloupia turuturu* contre le Sindbis Virus (SINV) (Hudson *et al.* 1999). Une étude de 2012 a mis en évidence l'activité antioxydante d'extraits de *Grateloupia lancifolia*, ainsi que leur potentialité d'utilisation en tant

qu'inhibiteurs de la cholinestérase et de la tyrosinase. Ces résultats sont intéressants en ce qui concerne les maladies neurodégénératives (Nguyen et Kim 2012). Un récent article du quotidien Ouest France (Guilmo 2013 et communication personnelle Eric Deslandes, Avril 2013) fait état d'une étude ayant testé l'effet d'une molécule extraite de l'algue rouge *Grateloupia doryphora* sur des rats affectés de leucémie humaine. Cette molécule permettrait de guérir 75% des rats utilisés dans l'étude.

Plusieurs études ont mis en évidence l'activité anticoagulante de carraghénanes extraits de *Grateloupia turuturu* et de *Grateloupia dichotoma* ainsi que les galactanes sulfatés de *Grateloupia indica* (Shanmugam et Mody 2000).

De plus, des extraits de *G. turuturu* à activité antimicrobienne suggèrent que cette macroalgue pourrait constituer une source de composés à activité antifouling pour des applications industrielles (littéralement anti-encrassement) (Hellio *et al.* 2004; Plouguerné 2006). Une étude de 1998 a montré que des extraits aqueux de *G. turuturu* ont un effet activateur de croissance sur la microalgue *Isochrysis galbana* (Cho *et al.* 1998).

Pour valoriser une macroalgue, dont la composition biochimique varie annuellement, il peut être intéressant d'étudier l'effet de différentes variables environnementales sur le développement et la composition biochimique de cette ressource. Ainsi, l'effet des paramètres environnementaux (lumière, température, salinité, durée d'émersion, hydrodynamisme...) sur la biologie et la distribution des algues est présenté dans le paragraphe qui suit.

## **5. Rôles des paramètres environnementaux sur la biologie et la distribution des algues**

Le milieu marin constitue un milieu dont les paramètres environnementaux sont très variables. Ils correspondent à des paramètres biotiques ou abiotiques, changeant en permanence. La notion de salinité est le caractère essentiel de l'eau de mer. La teneur en chlorure de sodium est de l'ordre de  $35 \text{ g.L}^{-1}$  mais elle est très variable selon les régions. La lumière, la température, la salinité, le pH, l'**hydrodynamisme**<sup>32</sup>, la durée d'émersion, la nature du substrat, les prédateurs, etc. sont des paramètres aboutissants à une variété d'habitats qui vont avoir alors un impact sur la diversité des algues les occupants. Les

---

<sup>32</sup> État d'agitation des masses d'eau.



algues présentent des adaptations mais également des exigences. Seuls quelques paramètres abiotiques sont présentés et étudiés dans ce chapitre.

### 5.1. La lumière

Comme dit précédemment, les algues sont des organismes photosynthétiques, par conséquent la lumière est un paramètre indispensable à leur développement. Ce facteur intervient sur trois plans : sa quantité (intensité lumineuse), sa qualité (nature des radiations) et sa **photopériode**<sup>33</sup>. La photopériode est un facteur important dans le développement des algues. Ces variations sont responsables du déclenchement de phénomènes reproducteurs ou de l'apparition d'espèces saisonnières, printanières ou estivales (Cabioc'h *et al.* 2006). La lumière et la profondeur sont des paramètres étroitement liés. En effet, la couche d'eau joue un rôle de filtre, ainsi selon la profondeur certaines longueurs d'ondes sont retenues et ne peuvent atteindre le fond et donc les espèces qui s'y développent. Une représentation de la transmittance de la lumière du soleil à travers l'eau de mer en fonction de la profondeur est présentée en Figure 26.

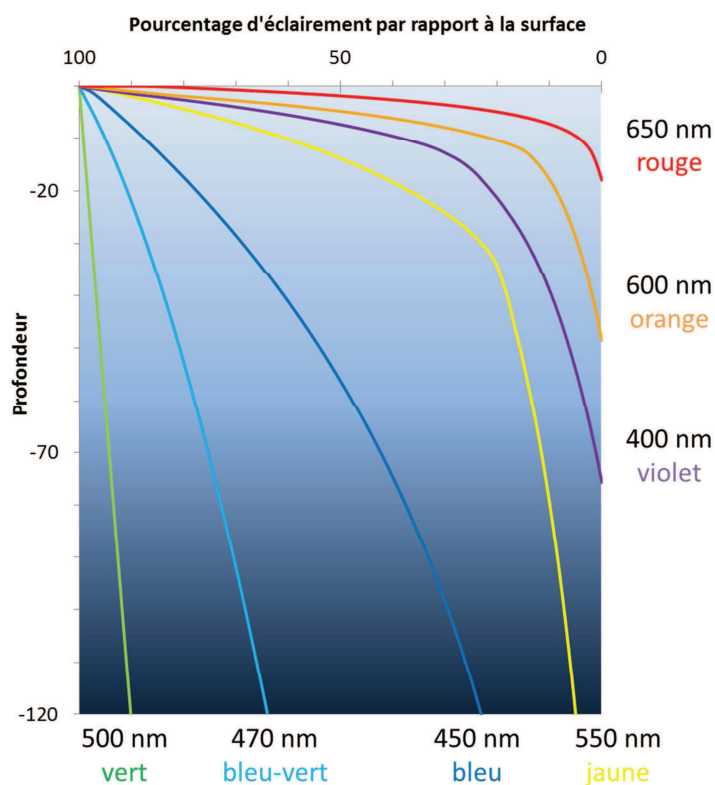


Figure 26 : évolution du pourcentage d'éclairement en fonction de la profondeur, d'après Gayral et Cosson 1986

<sup>33</sup> Succession régulière de l'alternance d'une période de lumière (jour) et d'une période d'obscurité (nuit) définies.

Les radiations rouges (>600 nm) sont absorbées dans les premiers mètres, à 10 m de profondeur la lumière est plutôt de couleur verte et peu de lumière atteint les 100 m, au-delà de 1000 m c'est la nuit noire. L'atténuation de la lumière sous l'eau est essentiellement due à l'absorption, la diffusion ayant une moindre importance. Cette atténuation est fonction de la longueur d'onde et des caractéristiques physiques et chimiques de l'eau de mer. Il y a une corrélation évidente entre les profondeurs auxquelles les algues se développent et la composition de leur antenne collectrice. Algues vertes, brunes et rouges ont des compositions pigmentaires différentes et n'absorbent pas avec la même efficacité l'ensemble des radiations lumineuses. En théorie, les algues vertes se développent en haut de l'estran dans de faibles profondeurs (pour capter les radiations rouges), puis les algues brunes à un niveau intermédiaire et enfin les algues rouges aux profondeurs les plus importantes (recherchant les radiations vertes). Cependant, sur le terrain, il est facile d'observer que cette stratification n'est pas respectée notamment par la présence d'algues rouges et brunes au même niveau que les algues vertes. Les algues rouges présentent des besoins en énergie lumineuse faibles, c'est pourquoi elles sont situées dans le niveau bas de l'estran, dans une zone de faible intensité lumineuse. Certaines algues peuvent se développer dans des milieux exposés à la lumière, elles sont alors qualifiées de **photophiles**<sup>34</sup> (c'est le cas des espèces de *Fucus*, *Ascophyllum nodosum*, ou l'algue rouge *Osmundea osmunda*). À l'inverse, il existe des espèces qui vont préférer rester dans des zones ombragées comme des fissures, des cavités superficielles ou encore sous d'autres espèces d'algues (par exemple l'algue rouge *Catenella opuntia* ou l'algue brune *Halopteris filicina*) elles sont alors dites **sciaphiles**<sup>35</sup>. Le phénomène de marée va avoir un impact sur la qualité (composition) de la lumière incidente. En effet, dans la zone de balancement des marées, l'épaisseur de la couche d'eau (le filtre) varie continuellement et va donc entraîner des variations.

Les algues répondent ainsi aux variations lumineuses, aussi bien sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif (Ramus *et al.* 1976a; Ramus *et al.* 1976b; Dring *et al.* 1996). Par exemple, à faible intensité lumineuse, les algues rouges synthétisent plus de pigments photosynthétiques. De même, chez les microalgues, de nombreuses études montrent que la composition pigmentaire et la quantité de pigment synthétisée varient selon la qualité de la lumière et aussi selon la quantité de lumière (Rhee et Briggs 1977; Tandeau de Marsac *et al.* 1980; Talarico et Maranzana 2000; Mishra *et al.* 2012). Une étude de 1990 a mis en évidence une diminution de la teneur en phycobiliprotéines et une augmentation de la teneur en chlorophylle *a* en réponse à une augmentation de l'intensité lumineuse chez l'algue rouge

---

<sup>34</sup> Organisme qui apprécie la lumière (s'oppose à sciaphile).

<sup>35</sup> Organisme qui apprécie les zones d'ombre (s'oppose à photophile).

*Corallina elongata* (Algarra *et al.* 1990). Selon une étude plus récente de 2012, qui a étudié l'effet de la qualité de la lumière sur la production de C-phycoérythrine chez la cyanophycée *Pseudanabaena sp.*, les lumières vertes et bleues semblent augmenter la production de C-PE par rapport à la lumière blanche, tandis que les lumières jaunes et rouges semblent diminuer cette production (Mishra *et al.* 2012).

## 5.2. La température

La température des océans varie de -1,9°C à 30°C. Il existe des variations verticales dues à la profondeur (pression, densité), qui sont nettement plus importantes que les variations horizontales qui sont fonction de la latitude. Ainsi on distingue différentes zones biogéographiques (Lüning 1990). Par conséquent les algues se développent aussi bien aux tropiques qu'aux pôles. Dans un lieu donné, la température présente des variations temporelles telles que les variations journalières et saisonnières (De Reviere 2003b). Les fluctuations journalières sont importantes dans les niveaux supérieurs de l'estran. Elles s'atténuent fortement en profondeur, où le brassage des masses d'eau par les courants assure une homogénéisation (algues plutôt **sténothermes**<sup>36</sup>). Les espèces situées en haut de l'estran sont donc nécessairement des algues eurythermes (Cabioc'h *et al.* 2006).

De même que la lumière, la température est un facteur qui va induire des modifications au niveau de la teneur en pigment. À des températures basses (<8°C) ou très élevées, les phycobiliprotéines ne s'agrègent plus en phycobilisomes (Galland-Irmouli 1999). Une étude de 1998 a mis en évidence le lien entre température de culture et teneur en phycoérythrine et biomasse algale au niveau de la cyanophycée *Nostoc sp.* en déterminant une température optimale de 36°C (Reis *et al.* 1998). Une autre étude de 2001 a mis en évidence qu'à 0°C il y avait un découplage du phycobilisome au niveau des centres réactionnels chez *Spirulina platensis* (Li *et al.* 2001). Cela montre que la température induit des variations au niveau de l'appareil photosynthétique.

## 5.3. La salinité

Le chlorure de sodium n'est qu'un des très nombreux sels composant l'eau de mer. D'autres éléments (sulfate, bicarbonate, sodium, magnésium, calcium, potassium, brome, fluor, etc.) entrent dans sa composition et vont entraîner des variations de nombreuses propriétés (densité, conductivité, pression osmotique, etc.). Certaines algues sont capables de supporter de grandes variations de salinité, elles sont qualifiées d'euryhalines, et d'autres qui en sont incapables et sont dites **sténohalines**<sup>37</sup>. De nombreuses algues régulent plus ou

---

<sup>36</sup> Organisme incapable de supporter de grandes variations de température (s'oppose à eurytherme).

<sup>37</sup> Organisme incapable de supporter de grandes variations de salinité (s'oppose à euryhalin).

moins leur pression osmotique avec des métabolites tels que le mannitol, chez les algues brunes, le digénéaside ou le floridoside chez les algues rouges (De Reviers 2003a). Dans la zone de balancement des marées, les algues peuvent subir des variations de salinité liées à l'émersion à savoir concentration en sel du milieu lors de phénomènes de dessiccation (soleil, vent) ou dilution du milieu par l'eau de pluie.

En 1998, une équipe a cherché à mettre en évidence l'impact de l'intensité lumineuse et de la salinité sur la composition en acides gras d'algues exposées à différentes conditions (Floreto et Teshima 1998). Pour cela ils ont mis en culture trois algues chacune représentative d'un groupe : *Ulva pertusa* (Chlorophycées), *Grateloupia sparsa* (Rhodophycées) et *Sargassum piluliferum* (Phéophycées) cultivées dans plusieurs conditions : deux intensités lumineuses (faible et haute) et trois salinités (faible : 10‰, normale : 35‰ et élevée : 50‰). L'étude porte sur la composition lipidique mais également sur la composition en protéines et en sucres hydrosolubles. Cette étude montre que pour les trois espèces, la lumière n'induit pas de modification de la composition biochimique (lipides totaux, sucres hydrosolubles et protéines totales). La salinité présente un effet sur la composition biochimique sur les trois espèces. Lorsque *Grateloupia sparsa* et *Ulva pertusa* sont cultivées à faible salinité, elles présentent une teneur en protéines plus élevée que lorsqu'elles sont cultivées en conditions normales. De même, à faible salinité, une augmentation du contenu en sucres solubles est constatée chez *Ulva pertusa*. Seule *Sargassum piluliferum* présente une légère augmentation de la teneur en lipides totaux lorsqu'elle est cultivée à forte salinité. En ce qui concerne l'augmentation des protéines totales induite par une faible salinité chez *Grateloupia sparsa*, ces chercheurs ont émis l'hypothèse que la faible salinité induit une augmentation de la synthèse d'enzymes, comme par exemple l' $\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.22), qui sont responsables de la digestion de carbohydrates osmotiquement actifs et du floridoside chez les Rhodophycées. Cette hypothèse fait suite aux résultats obtenus en 1983 par Reed. Une autre étude a également mis en évidence que l'activité de l' $\alpha$ -galactosidase est augmentée lorsque les algues *Gracilaria sordida* et *Gracilaria tenuistipitata* sont transférées dans un milieu de culture hypo-salin (Yu et Pedersen 1990). Ainsi la salinité du milieu de culture induit des modifications au niveau du contenu biochimique.

#### **5.4. La durée d'émersion**

Selon la position des algues dans la zone de balancement des marées, celles-ci peuvent ne jamais être émergées ou l'être pendant une durée plus ou moins importante. Ainsi plus une algue est en haut de l'estran et plus elle reste émergée. La première conséquence de l'émersion est la dessiccation qui peut être amplifiée par la chaleur, le gel ou le vent. Celle-ci

provoque un stress osmotique par déshydratation et accumulation de sel dans le milieu où se développe l'algue. Un stress inverse est provoqué en cas de pluie, par l'apport d'eau douce. Ainsi se met en place un gradient vertical le long de l'estran. Cependant des algues de bas niveau peuvent se retrouver hautes dans l'estran si elles se trouvent protégées de l'émersion dans une cuvette. Ces cuvettes sont soumises à **dessalure**<sup>38</sup> ou évaporation ainsi qu'à des variations de températures et ce d'autant qu'elles sont petites et situées en hauteur. Elles seront alors surtout colonisées par des algues euryhalines et eurythermes (De Reviers 2003b).

La lumière incidente est également plus intense lors de l'émersion, ainsi les algues ont mis en place des systèmes de protection contre cette photo-oxydation grâce à des mécanismes actifs de réparation, des pigments caroténoïdes ou des molécules absorbant les UV (Lobban et Harrison 1994).

### 5.5. L'hydrodynamisme

L'hydrodynamisme est un facteur environnemental qui joue également un rôle important sur la flore de l'estran. En effet, sur la base de l'hydrodynamisme, deux types d'habitats sont distingués : le mode abrité qui correspond aux zones calmes, protégées des vagues, et le mode battu qui correspond aux zones où les vagues se fracassent sur les rochers. Entre ces deux habitats on peut également parler d'habitat semi-battu ou semi-abrité. Ainsi certaines algues ne se développeront exclusivement qu'en mode abrité (*Ascophyllum nodosum*) ou en mode battu (*Alaria esculenta*). D'autres espèces peuvent se développer dans les deux types d'habitats mais elles présentent alors des modifications morphologiques : plus le mode est battu et plus les lanières de *Fucus serratus* deviennent de plus en plus étroites, *Fucus vesiculosus* perd de plus en plus ses vésicules gazeuses (flotteurs) jusqu'à les perdre totalement en mode très battu (Lobban et Harrison 1994). L'hydrodynamisme a également un impact sur les substrats meubles et sur les rochers, mais également sur la fixation des zygotes et des spores. Il est indispensable dans la répartition des substances dissoutes dans le milieu (De Reviers 2003b). Il est lié aux vagues, à la marée et aux courants. Ces déplacements d'eau créent des conditions d'humectation et des forces d'arrachement et d'abrasion auxquelles les organismes réagissent. Le peuplement benthique aussi bien animal que végétal varie ainsi fortement en fonction du mode (Cabioc'h *et al.* 2006).

---

<sup>38</sup> Réduction de la salinité de l'eau de mer résultant soit d'un mélange d'une eau marine avec une eau continentale, soit de la pluie.

## 5.6. La nature du substrat

La nature chimique du substrat est a priori sans influence sur le développement de l'algue, puisqu'elles n'en tirent pas leurs éléments nutritifs. Cependant, il joue un rôle fondamental par sa texture et son degré de cohésion, qui sont deux paramètres pouvant limiter la solidité de la fixation de l'algue (Cabioc'h *et al.* 2006). Il existe un grand nombre de substrats. Sur les vases littorales fines, et dans le sable très peu de macroalgues se développent, mais plutôt des microalgues et des phanérogames. De même, les macroalgues se développent très rarement sur des graviers surtout pour un problème de stabilité. Les galets étant plus stables ils sont alors colonisés essentiellement par des algues encroûtantes. Ainsi la majorité des macroalgues se développe sur substrat rocheux. Elles se développent sur tout support présent en mer : bouées, signalétique, ports, coques des bateaux. Certaines espèces sont principalement ou strictement **épiphytes**<sup>39</sup>, et avec en général une préférence pour un hôte. D'autres sont **épizoïques**<sup>40</sup>, **endophytes**<sup>41</sup>, ou encore **endozoïques**<sup>42</sup> et généralement symbiotiques. Enfin il existe des algues parasites, qui sont des parasites d'autres macroalgues exclusivement (De Reviens 2003b).

Après présentation des recherches bibliographiques effectuées sur ce sujet, les matériels et méthodes utilisés pour ces travaux sont présentés dans le chapitre suivant. Il regroupe les protocoles communs aux différentes études de ce mémoire, tandis que les protocoles spécifiques à chaque étude sont présentés au sein de chaque chapitre.

---

<sup>39</sup> Organisme vivant sur un végétal, sans pour autant en être le parasite.

<sup>40</sup> Organisme vivant sur un animal, sans pour autant en être le parasite.

<sup>41</sup> Organisme se développant à l'intérieur d'un végétal de manière symbiotique (endosymbiote).

<sup>42</sup> Organisme se développant à l'intérieur d'un animal, sans pour autant en être le parasite.

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

### 1. Matériel biologique

#### 1.1. *Grateloupia turuturu*

Les thalles ont été collectés à différentes périodes entre 2010 et 2013 selon la biodisponibilité, dans la zone intertidale de la côte Atlantique (Batz-sur-Mer et Le Croisic). Ces prélèvements représentent approximativement 60 kg. Les épiphytes sont retirés et les échantillons sont rincés successivement à l'eau du robinet et à l'eau osmosée. Ils sont épongés sur papier absorbant (Figure 27) puis sont placés au congélateur (-20°C) pour ensuite être lyophilisés.



Figure 27 : étapes de conditionnement des algues après prélèvements

#### 1.2. *Porphyridium cruentum*

Les spécimens de *Porphyridium cruentum* proviennent de la souche UTEX 161, de l'Université du Texas, Etats-Unis (Figure 28). Ils sont placés dans un PhotoBioRéacteur tubulaire Air-Lift (PBR, 100 L), inoculés à partir d'une culture réalisée au préalable dans un PhotoBioRéacteur tubulaire Air-Lift (PBR, 10 L). Dans les deux cas, du milieu de culture Hemerick légèrement modifié afin d'augmenter la productivité a été utilisé. La biomasse est récupérée à partir de la culture finale par centrifugation de la suspension cellulaire à 1500 x g. Après une nouvelle centrifugation, 15000 x g pendant 10 min à 5°C, le culot obtenu est lyophilisé (environ 30 g MS).





Figure 28 : observation microscopique d'une culture de *Porphyridium cruentum* (Jubeau 2012)

## 2. Méthodologie d'extraction et de pré-purification

### 2.1. Extraction des composants hydrosolubles

Les algues lyophilisées sont réduites en fine poudre par cryobroyage à l'aide d'un mortier et d'un pilon et d'azote liquide (Figure 29, étape 1). La poudre algale obtenue est ensuite mise en suspension dans du tampon phosphate (pH 7,1 ; 20 mM) dans un ratio de 1/20 (m/v) pendant 20 min à 4°C (Figure 29, étape 2). La suspension est mise à centrifuger à 25000 x *g* pendant 20 min (Figure 29, étape 3). Toutes les étapes sont réalisées à 4°C. Le surnageant obtenu correspond à l'extrait brut aqueux (EB) et contient tous les composants hydrosolubles de la matrice algale. Toutes les extractions sont réalisées en triplicat.

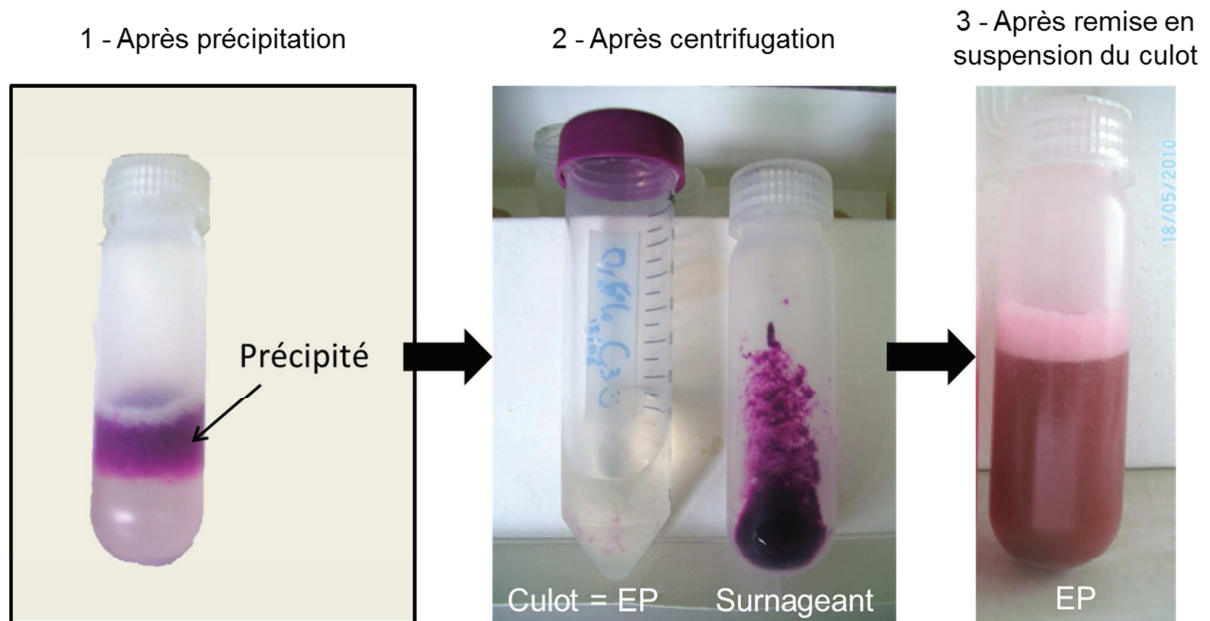




Figure 29: étapes du procédé d'extraction des composants hydrosolubles

## 2.2. Pré-purification au sulfate d'ammonium

La précipitation des protéines par adjonction de sel (ici le sulfate d'ammonium) ou précipitation par *salting-out* joue sur le degré de solubilité des protéines. Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition, il est possible d'en séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins rapidement quand la force ionique de la solution qui les contient est modifiée. Le précipité protéique obtenu résulte de la formation d'un «agrégat» entre les différentes protéines dont les propriétés de solubilité ont été modifiées.



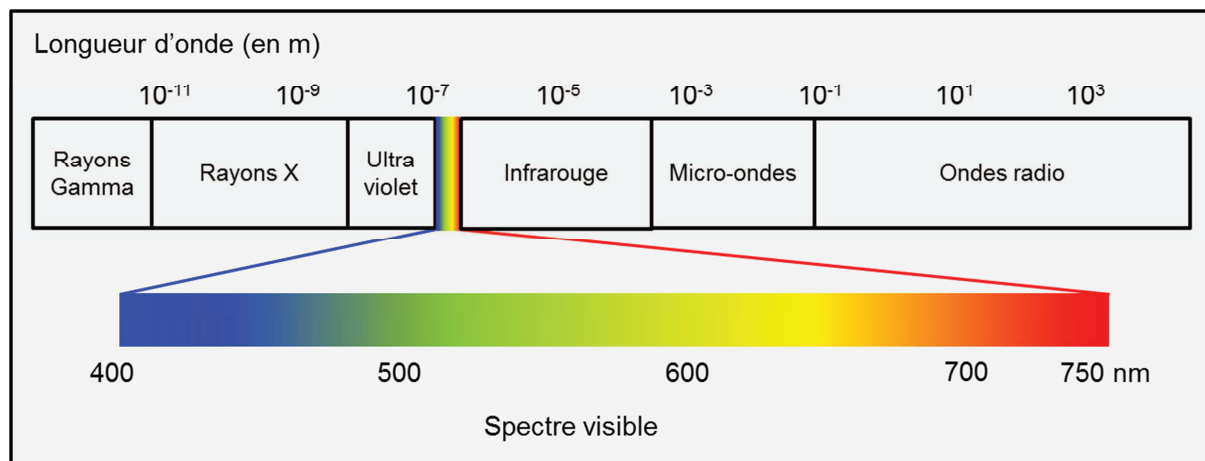
**Figure 30 : étapes de précipitation d'un extrait brut de R-PE au sulfate d'ammonium (85%)**

L'extrait brut est amené à 85% de saturation en sulfate d'ammonium ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (solide), à 4°C pendant 2h et sous agitation. Le précipité est récupéré après centrifugation (25000 x g ; 20 min ; 4°C) puis il est remis en suspension dans du tampon phosphate (pH 7,1 ; 20 mM). La suspension protéique est qualifiée d'extrait protéique (EP) (Figure 30).

### 3. Matériel et procédures analytiques

#### 3.1. Spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une technique d'analyse qualitative et quantitative, de substances absorbant un rayonnement électromagnétique de longueur d'onde comprise entre 200 et 800 nm selon le type d'appareil utilisé. Lorsqu'une substance absorbe dans le domaine du visible ( $400 \text{ nm} < \lambda < 750 \text{ nm}$ ) (Figure 31), l'œil ne perçoit en regardant cette substance, que les radiations non absorbées, c'est pourquoi celle-ci apparaît colorée, de la couleur complémentaire à celle de la radiation absorbée. C'est ainsi que la phycoérythrine de couleur rose pourpre, absorbe dans le vert.



**Figure 31: spectre électromagnétique**

Un faisceau parallèle de lumière monochromatique (de longueur d'onde  $\lambda$ ) d'intensité  $I_0$  traverse une solution absorbante de concentration  $C$  sur une cuve de longueur  $l$ .

L'intensité du faisceau émergent est  $I$ . On parle alors de transmittance ( $T$ ) correspondant au rapport entre l'intensité de la lumière transmise et l'intensité de la lumière incidente. Ainsi la relation suivante peut être obtenue :  $A = -\log T$ . D'après la loi de Beer-Lambert, la concentration d'un composé en solution peut être calculée selon la formule suivante :

$$A = \epsilon_{\lambda} l C$$

$C$  : concentration ( $\text{mol.L}^{-1}$ ) de la solution ;

$\epsilon_{\lambda}$  : coefficient d'extinction molaire du soluté ;

$l$  : longueur de la cuve (cm).

$\epsilon_{\lambda}$  dépend de la substance absorbante, de la longueur d'onde du faisceau  $\lambda$  et de la température. La loi de Beer-Lambert est une loi limite, valable si la solution est diluée et si on se place à une longueur d'onde proche du maximum d'absorption.

Les mesures d'absorbance ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre UVIKON-XS dans des cuves quartz de 1 cm de longueur de trajet optique. Les spectres d'absorption ont été réalisés de 200 à 800 nm. Toutes les mesures ont été effectuées à température ambiante.

### 3.2. Fluorimétrie

La fluorimétrie étudie l'émission de lumière par des molécules, en solution ou à l'état solide, après excitation par des photons appartenant au domaine du visible ou du proche ultraviolet. Lorsqu'une molécule fluorescente absorbe un photon d'énergie, les électrons vont passer de l'état fondamental ( $E_0$ ) à l'état excité ( $E_1$ ) instable. Ils vont ensuite revenir à l'état vibrationnel le plus bas de  $E_1$  par perte de microchaleur, c'est la relaxation. Ils vont finalement retourner à l'état fondamental  $E_0$  avec émission d'un photon de fluorescence.

Les mesures d'émission de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre de fluorescence LS 55, PerkinElmer dans des cuves quartz de 1 cm de longueur de trajet optique. La longueur d'onde d'excitation est de 498 nm. Tous les spectres ont été réalisés à température ambiante (Figure 32).

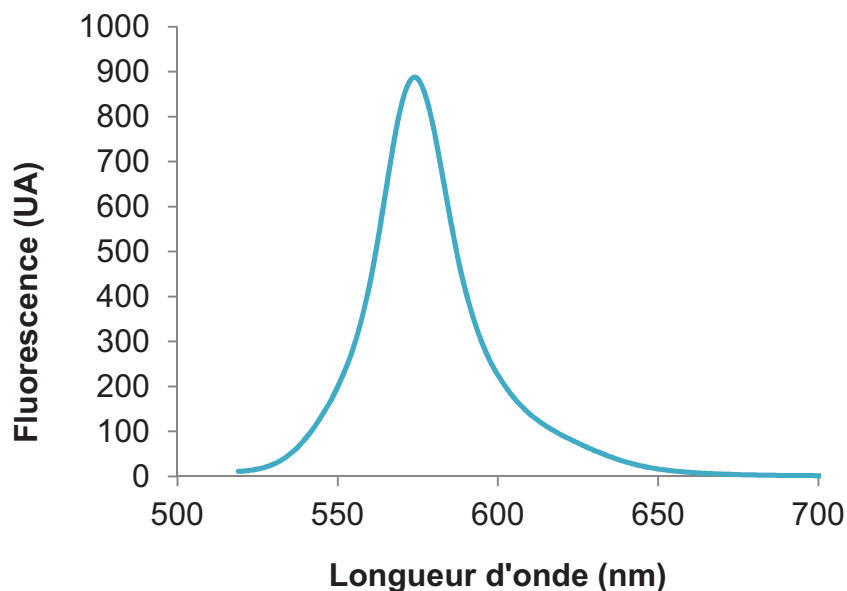


Figure 32: spectre de fluorescence de la R-Phycoérythrine de *Grateloupia turuturu*

### 3.3. Chromatographie

L'équipement chromatographique est un appareillage SCHIMADZU comprenant un système de pompe, une vanne rhéodyne et un détecteur à barrette de diode (Figure 33).

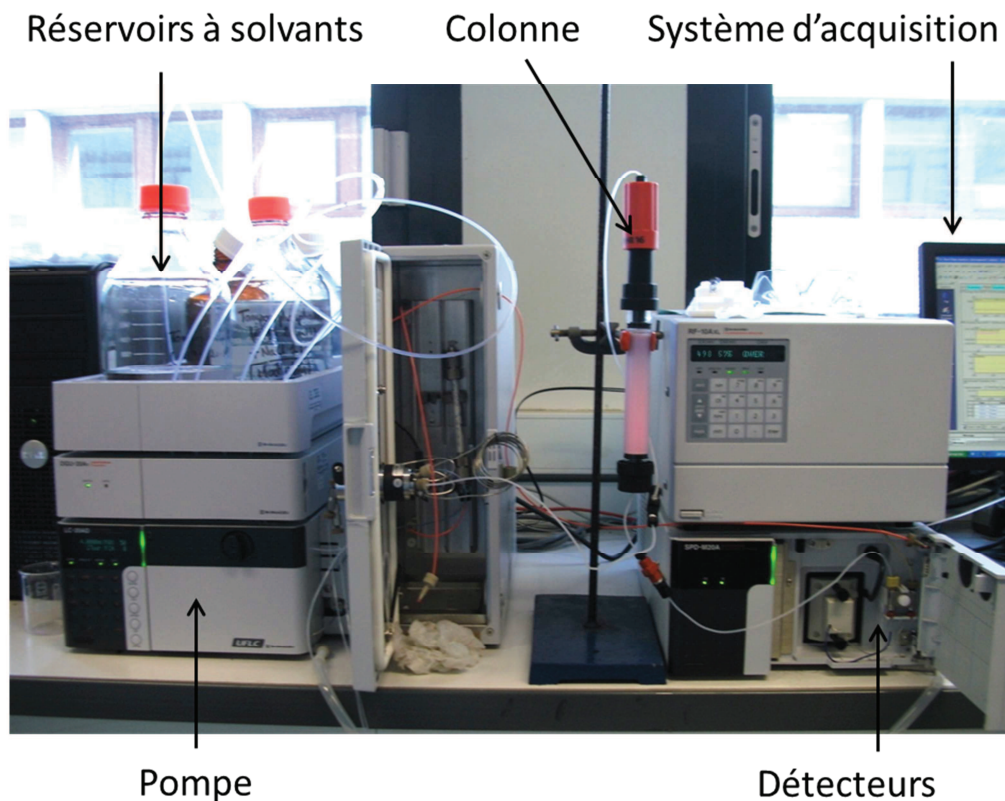
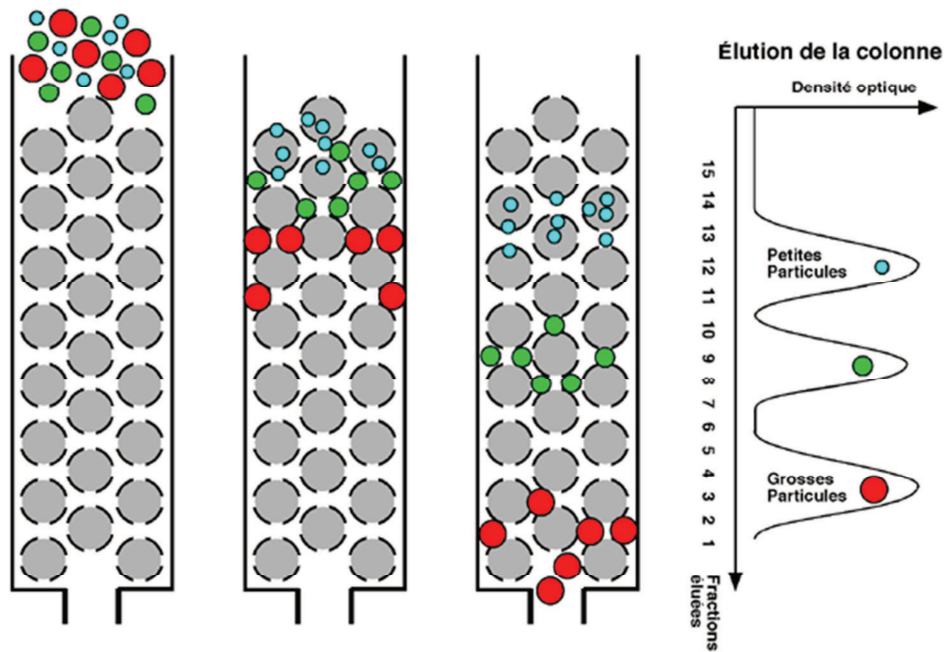


Figure 33 : composition de la chaîne de chromatographie

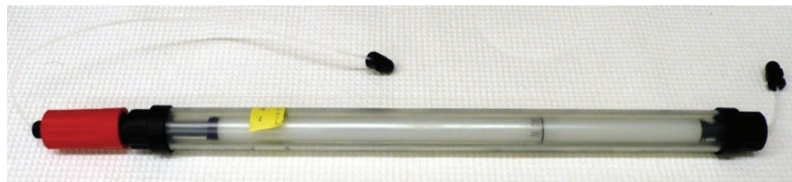
#### 3.3.1. Chromatographie de gel filtration

La chromatographie de gel filtration permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. La phase stationnaire est un gel composé de billes poreuses. L'échantillon est élué par la phase mobile (tampon phosphate) et les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores des billes) sont exclues et sont ainsi éluées les premières, dans le volume mort ( $V_0$ ). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans les billes du gel, leur migration est alors freinée. Les molécules sont donc éluées dans l'ordre inverse des masses moléculaires (Figure 34). Il existe une relation linéaire entre le volume d'éluion et le logarithme de la masse moléculaire.



**Figure 34 : représentation schématique du principe de la chromatographie de gel filtration (Leblanc 2013)**

La chromatographie de gel filtration est utilisée à la fois pour estimer la masse moléculaire apparente de la R-PE, pour confirmer la pureté des fractions obtenues après purification et pour observer l'effet de protectants et conservateurs sur la stabilité du pigment. L'EB (20  $\mu$ L) est injecté sur une colonne Superdex 200 HR 10/30 (10 x 300 mm, Amersham) (Figure 35).



**Figure 35 : colonne de chromatographie de gel filtration Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences)**

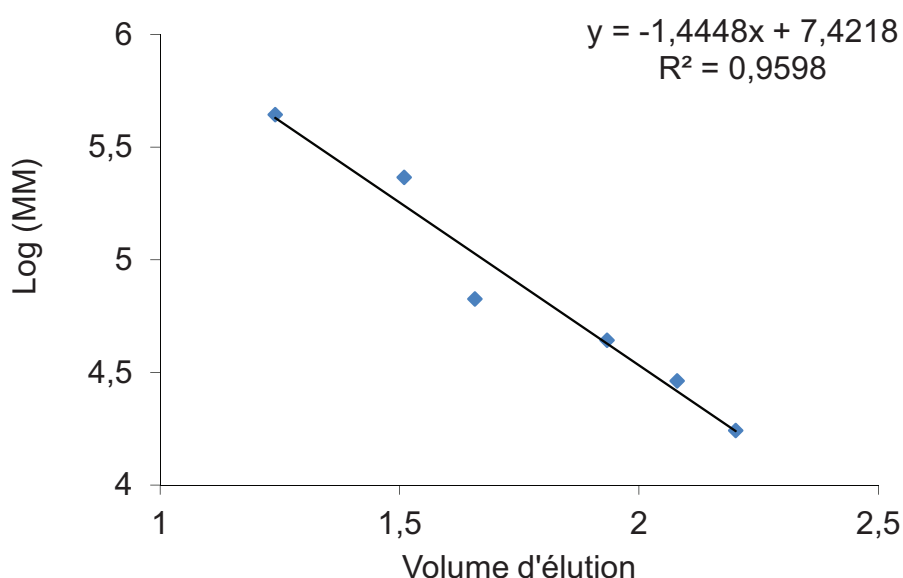
Cette colonne a un volume total d'environ 24 mL. Le gel Superdex 200 est constitué par des liaisons covalentes hautement réticulées entre du dextrane (polymère ramifié de glucose = colloïde) et des billes d'agarose poreuses (13 à 15  $\mu$ m de diamètre). Les propriétés de séparation du support composite sont essentiellement déterminées par le dextrane. La courbe de sélectivité donne une excellente résolution des protéines et des peptides dans une plage de poids moléculaire de 10 000 à 600 000 Da (Amersham Biosciences 2013).



La colonne est pré-équilibrée avec le tampon phosphate de sodium (pH 7,1 ; 20 mM) à un débit de 0,5 mL/min puis l'élution est réalisée dans les mêmes conditions. La détection est réalisée à 280 nm et à 565 nm.

Afin de déterminer la masse moléculaire apparente de la R-PE (et des autres composants), une calibration a été effectuée à l'aide de protéines de références, à savoir : la ferritine (440 kDa), la catalase (232 kDa), la BSA (67 kDa), l'ovalbumine (44 kDa), la myoglobine (17,5 kDa) et la vitamine B12 (1,35 kDa).

Une droite de calibration a été tracée (Figure 36) pour déterminer la masse moléculaire de la R-PE.



**Figure 36 : droite de calibration de la colonne de chromatographie de gel filtration (Superdex 200 HR 10/30)**

### 3.3.2. Chromatographie d'échange d'anions

Le principe de la chromatographie d'échange d'ions repose sur la différence d'interaction entre les molécules chargées à séparer, la phase stationnaire et la phase mobile.

La phase stationnaire est constituée d'un support macromoléculaire chimique comme le dextrane, la cellulose ou le gel de polyacrylamide sur lesquels sont greffés par liaison covalente des groupements acides ou basiques. Les groupements acides sont susceptibles de se charger négativement lorsqu'ils sont en solution dans une solution tampon dont le pH est supérieur à leur pKa. Il s'agit alors d'échangeur de cations. Si les groupements sont basiques, ils sont susceptibles de se charger positivement lorsque ceux-ci sont dans une solution tampon de pH inférieur à leur pKa. Dans ce cas, il s'agit alors d'échangeur d'anions.

La colonne mise en oeuvre est une colonne de chromatographie d'échange d'anions, DEAE Sepharose Fast Flow (DEAE Sepharose FF, 26 x 100 mm). Il s'agit d'une base faible : le diethylaminoéthylammonium (DEAE).

La chromatographie d'échange d'ions se déroule en 4 étapes :

1) la résine est équilibrée avec un tampon de pH tel que le groupement porté par l'échangeur d'ion soit ionisé ;

2) l'échantillon à séparer est déposé sur la colonne. La solution est dans le même tampon que le pH qui a permis de ioniser l'échangeur d'ions ;

3) les molécules fixées sur la résine sont éluées soit :

→ en modifiant le pH de la phase mobile de telle sorte que les molécules qui sont chargées ne le soient plus (ou qu'elles portent une charge de même signe que l'échangeur d'ions). Il n'y a plus alors d'interaction électrostatique entre les molécules et le groupement chargé porté par la résine ;

→ en ajoutant un sel (à concentration croissante) qui apporte forcément un ion de même charge que les molécules fixées à la résine : cet ion s'appelle un contre-ion.

4) l'échangeur d'ions est régénéré par lavage avec une solution de pH permettant de remettre les charges dans leur état initial (tampon d'élution).

Cette technique est mise en oeuvre pour purifier la R-PE de l'extrait brut. La colonne est équilibrée avec du tampon phosphate (pH 7,1 ; 20 mM) à un débit de 4 mL/min. L'EB enrichi en R-PE est déposé en tête de colonne et celle-ci est ensuite lavée avec le tampon jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm (absorbance des protéines totales) soit stable et la plus faible possible. Le gradient a été réalisé avec du tampon phosphate (pH 7,1 ; 20 mM) additionné de 1 M de NaCl à un débit de 4 mL/min. La purification est enregistrée à 280 et 565 nm grâce à un détecteur à barrettes de diodes (SPD-M20A, Shimadzu) et le logiciel Labsolutions/LC solution.

### **3.4. Electrophorèse en conditions dénaturantes : SDS-PAGE**

Les techniques d'électrophorèse sont fondées sur le déplacement des ions dans un champ électrique. Un ion chargé placé dans un champ électrique subit une force qui dépend du voltage appliqué et de la distance entre les électrodes. L'électrophorèse s'effectue sur un support poreux, gel d'agarose ou de polyacrylamide qui retarde le mouvement des molécules en fonction de leurs dimensions relatives à la maille du gel (effet de tamisage



moléculaire). Le SDS ou dodécylsulfate ou laurylsulfate de sodium possède une longue queue hydrophobe qui interagit très fortement avec les chaînes polypeptidiques. Le nombre de molécules de SDS liées à un polypeptide est proportionnel à la longueur de la chaîne. Chaque molécule de SDS apporte deux charges négatives. Ainsi, l'ensemble de ces charges est très largement supérieur à la charge propre de la protéine. Le SDS est également un détergent qui rompt toutes les interactions et détruit les structures tertiaires et quaternaires des protéines. L'électrophorèse est habituellement réalisée en présence d'un agent réducteur, le plus souvent le  $\beta$ -mercaptoéthanol. Il réduit et clive les ponts disulfures éventuellement formés entre les chaînes des protéines. La mobilité électrophorétique des protéines en SDS-PAGE est inversement proportionnelle au logarithme de leur masse moléculaire. Ainsi, cette technique permet de déterminer la masse moléculaire d'une protéine ou d'une sous-unité protéique.

Le profil protéique de l'EB ainsi que des différentes fractions obtenues à l'issue de la purification par chromatographie d'échange d'anions sont déterminés à partir des fractions dialysées et lyophilisées et à l'aide d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) selon le protocole développé par Laemmli en 1970.

Le gel est composé d'un gel de séparation à 12% (m/v) de polyacrylamide dans du tampon Tris-HCl (1,5 M ; pH 8,8) contenant 0,1% de SDS (m/v) et d'un gel de concentration à 4% (m/v) dans du tampon Tris-HCl (0,5 M ; pH 6,8) avec 1% de SDS (m/v). Les gels sont préparés avant dépôt des échantillons ; ils sont constitués de puits dans lesquels les échantillons seront déposés. Avant dépôt des échantillons, ceux-ci sont préalablement dénaturés par incubation dans un tampon contenant : 6,25 mM de tampon Tris (pH 6,8), 2% (m/v) de SDS, 5% (m/v) de 2-mercaptoéthanol, 25% (m/v) de glycérol et 0,01% (m/v) de bleu de bromophénol. Ils sont ensuite chauffés au bain-marie pendant 10 min à 100°C. Les suspensions sont centrifugées à 500 x g pendant 10 secondes afin de séparer les substances insolubilisées des substances solubilisées. Les fractions sont déposées au niveau des puits à raison de 10  $\mu$ L par puits (à une concentration de 1 mg/mL).

Ces conditions ont été choisies en raison du protocole utilisé dans l'article de Galland-Irmouli *et al.* (2000) et de la notice d'utilisation du matériel (Bio-Rad) selon le protocole établi par Laemmli en 1970.

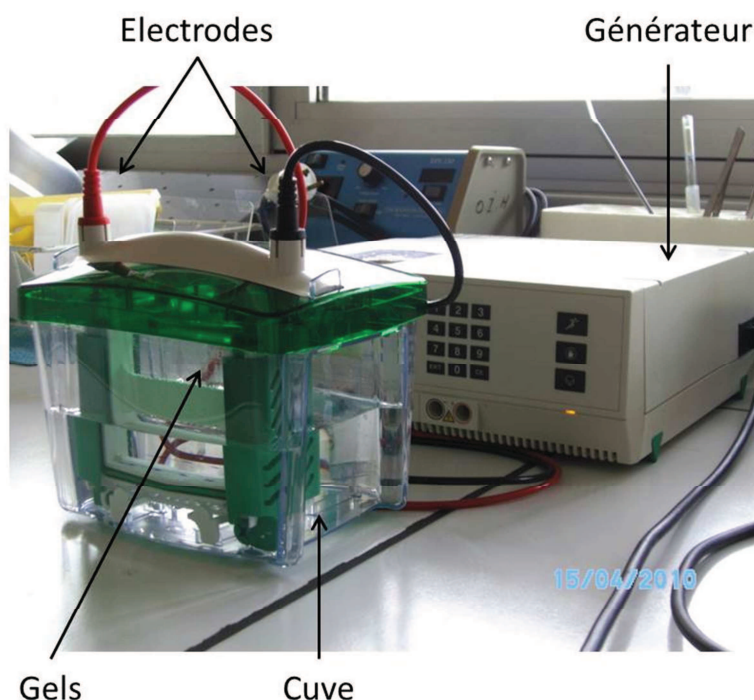


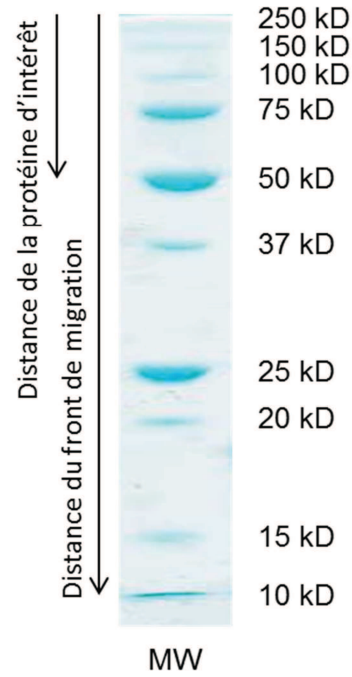
Figure 37: appareillage pour gels d'électrophorèse (Mini-Protean II, Bio-Rad)

La migration est réalisée à voltage constant (150 V) et après la séparation, les bandes protéiques sont révélées par détection de fluorescence (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System, Bio-Rad) ou par coloration au bleu de Coomassie (Tableau VIII).

Tableau VIII : protocole de coloration d'un gel d'électrophorèse

Étapes	Durée	Solvant	Composition	Température
1	5 min	Fixateur (= décolorant 1)	45% Méthanol 10% acide acétique qsp eau	ambiante
2	1h30	Colorant	2,5% (m/v) Brilliant Blue G250 45% Méthanol 10% acide acétique qsp eau	70°C
3	15 min	Décolorant 1	45% Méthanol 10% acide acétique qsp eau	ambiante
4	15 min	Décolorant 2	30% Méthanol 10% acide acétique qsp eau	ambiante

Un marqueur de taille (Precision Plus Protein™ All Blue Standards, Bio-Rad) est utilisé afin de déterminer la masse apparente des différentes bandes obtenues (Figure 38).



**Figure 38 : profil électrophorétique du marqueur de taille (MW)**

Le rapport frontal ( $R_f$ ) est déterminé à partir du marqueur de taille. Il correspond au ratio suivant :

$$R_f = \frac{\text{Distance de migration de la protéine d'intérêt (mm)}}{\text{Distance du front de migration (mm)}}$$

Ainsi, à partir des  $R_f$  et du log des masses moléculaires des standards du marqueur de taille, une relation polynomiale d'ordre 3 est obtenue (Figure 39). Elle permet alors de déterminer la taille des profils électrophorétiques de l'extrait brut et des fractions obtenues à l'issue de la purification.

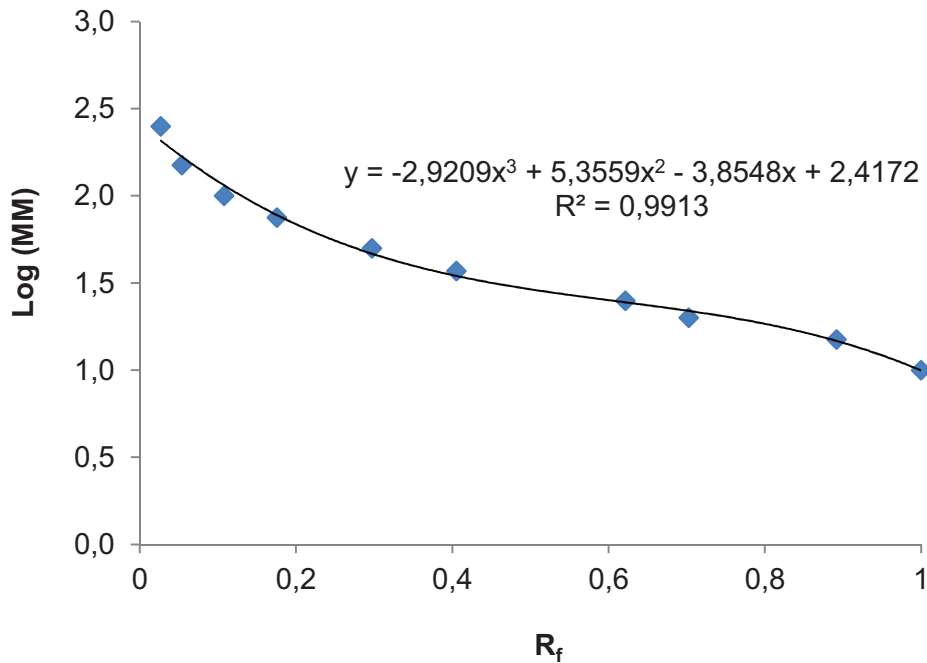


Figure 39 : courbe étalon pour la détermination de la taille des profils électrophorétiques

## 4. Caractérisation biochimique

Toutes les mesures biochimiques sont réalisées en triplicat.

### 4.1. La matière sèche

La matière sèche est déterminée par mise à l'étuve de 10 g d'algues fraîches pendant 6 heures à 105°C. La teneur en matière sèche est exprimée en pourcentage de matière fraîche.

### 4.2. Les cendres

La teneur en cendres est déterminée par incinération de 1 g de poudre algale dans un four à 550°C pendant 4h. Le contenu en cendres est exprimé en pourcentage de poids sec.

### 4.3. Les protéines totales

Le contenu en azote organique a été quantifié par la méthode de Kjeldhal (Miller et Miller 1948). Pour le doser dans sa totalité, il faut détruire les composés organiques de manière à obtenir tout l'azote sous une même forme minérale.

Une première étape de minéralisation est alors réalisée (Figure 40). L'objectif de cette étape est de dégrader la matière organique azotée sous forme de sel d'ammonium. Le pH acide permet au sel d'ammonium d'apparaître sous sa forme acide  $\text{NH}_4^+$ . La dégradation de la

matière organique azotée se fait en plaçant 1 g MS d'algues dans des tubes en présence d'un catalyseur et de 20 mL d'acide sulfurique à haute température (450°C). Après minéralisation (solution vert pâle), les tubes sont placés dans l'unité de distillation pour la seconde étape.



**Figure 40 : étape de minéralisation**

La seconde étape consiste en une étape de distillation de l'ammonium par ajout de soude (10 M) (Figure 41). La soude réduit l'ammonium en ammoniac. Celui-ci, volatil, va se condenser au contact d'un réfrigérant et être recueilli dans une solution d'acide borique (3%) contenant un indicateur coloré. La distillation est arrêtée lorsque le volume de distillat atteint environ 150 mL.



**Figure 41 : étape de distillation**

La dernière étape consiste en un titrage de l'ammoniac par une solution d'acide chlorhydrique, à l'aide d'un indicateur coloré, le rouge de méthyle. Le volume d'HCl ajouté est noté V (en mL). Le pourcentage d'azote est obtenu selon la formule suivante :

$$\%N = (1,4 \times V \times [HCl]) / m$$

V est le volume de HCl versé ; [HCl] est la concentration en HCl ; m est la masse d'échantillon introduite dans les tubes

Le contenu en protéines totales est estimé en multipliant le contenu en azote par un facteur de 6,25.

#### 4.4. Les protéines hydrosolubles

La teneur en protéines hydrosolubles totales de l'EB est déterminée par la méthode modifiée de Bradford (1976). Il s'agit d'une méthode de mesure de concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et un colorant : le bleu de Coomassie G250. Ce réactif, rouge/brun à l'état libre, prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines et par conséquent possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (à 595 nm) qui permet un dosage protéique très sensible.

Du réactif de Bradford (200 µL) est ajouté à 800 µL d'échantillon. L'absorbance est mesurée à 595 nm après homogénéisation des solutions. Le standard utilisé est la Serum Albumine Bovine (SAB). Une gamme de 0 à 8 mg/L est réalisée (Figure 42).

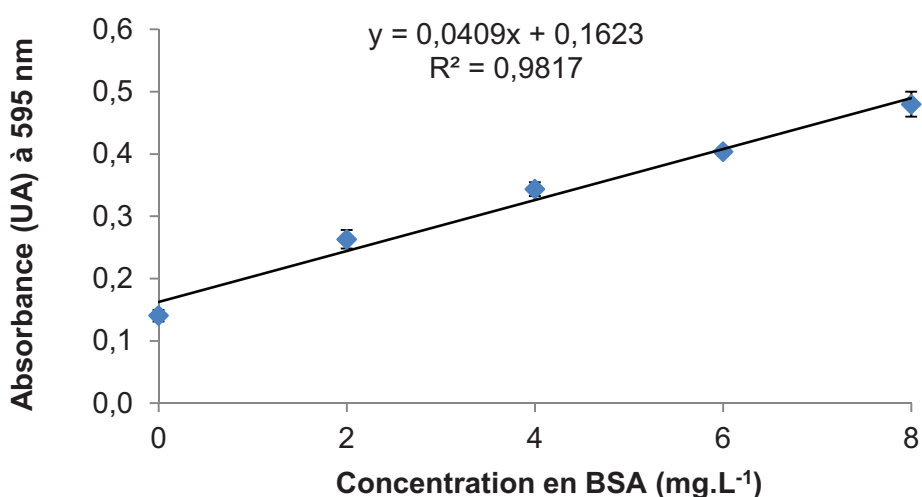


Figure 42 : gamme étalon du dosage des protéines hydrosolubles par la méthode de Bradford

#### 4.5. La concentration en R-PE et indices de pureté

La concentration en R-PE et l'indice de pureté (IP) sont déterminés dans les différentes fractions à l'aide d'un spectrophotomètre.

La concentration en R-PE est déterminée à partir de l'équation de Beer et Eshel (1985) :

$$[\text{R-PE}] \text{ (mg/mL)} = [(A_{565} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) \times 0,20] \times 0,12$$

Le spectre d'absorption de la R-PE présente trois pics : deux à 498 et 540 nm et un pic maximal à 565 nm (Figure 43). Le spectre permet d'observer la dénaturation ou la préservation de l'état natif de la R-PE.

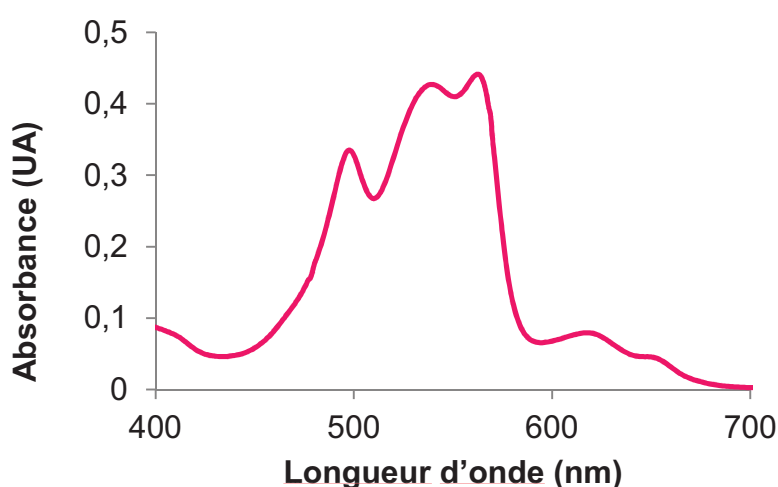


Figure 43 : spectre d'absorbance caractéristique de la R-PE de *Grateloupia turuturu*

L'indice de pureté est calculé selon le ratio :  $A_{565}/A_{280}$ . Il correspond au ratio entre l'absorbance maximale de la R-PE (565 nm) et l'absorbance des protéines totales (280 nm). Il est utilisé dans les protocoles de purification afin de visualiser l'efficacité des différentes étapes (Hilditch *et al.* 1991 ; Galland-Irmouli *et al.* 2000 ; Rossano *et al.* 2003 ; Niu *et al.* 2006 ; Sun *et al.* 2009). D'après Niu *et al.* (2006), il doit être supérieur à 3,2 pour considérer que la R-PE soit pure. Cependant, une autre étude explique que ce ratio doit être supérieur à 4,5 (Liu *et al.* 2005). La société Phyco-biotech ([www.phyco-biotech.com](http://www.phyco-biotech.com)) qui commercialise des phycobiliprotéines, indique que ce ratio doit être supérieur à 5. Ainsi, il ne semble pas exister de règle bien établie quant à l'utilisation et l'interprétation de ce ratio. Quoi qu'il en soit, celui-ci doit être le plus élevé possible.

D'autres ratios sont également utilisés dans ces études. Dans l'étude de Rossano *et al.* (2003), le ratio  $A_{565}/A_{495}$  est utilisé afin d'identifier le composé purifié ; il doit être inférieur à 1,5. Cependant, là encore, ils n'expliquent pas l'origine de ce ratio. Niu *et al.* (2006) utilisent

également ce ratio : il diminue lorsqu'il y a dissociation de la forme hexamérique. Là encore, les règles d'utilisation de ce ratio ne sont pas clairement définies.

Le ratio  $A_{620}/A_{565}$  est également calculé et doit être inférieur à 0,005 d'après Rossano *et al.* (2003). L'étude de Hilditch *et al.* (1991) explique ce ratio comme étant la pureté de la R-PE vis-à-vis de la phycocyanine puisque cette dernière absorbe à 620 nm. La société Phyco-biotech a également recours à ce ratio et elle indique qu'il doit être inférieur à 0,02. Liu *et al.* (2005) utilisent ce dernier ratio mais également le ratio  $A_{650}/A_{565}$ . En effet, les algues rouges synthétisent de la phycocyanine ( $\lambda_{\max} = 620$  nm) et de l'allophycocyanine ( $\lambda_{\max} = 650$  nm), qui entrent dans la structure du phycobilisome. Ainsi pour la détermination de la pureté de la R-PE ces ratios doivent être inférieurs à 0,001 et témoignent alors de l'absence de phycocyanine et d'allophycocyanine (Liu *et al.* 2005).

Ainsi dans cette présente étude, les quatre ratios suivants ont été calculés :

$$A_{565}/A_{280}$$

$$A_{565}/A_{495}$$

$$A_{620}/A_{565}$$

$$A_{650}/A_{565}$$

#### 4.6. La concentration en B-PE

La concentration en B-PE et l'IP sont déterminés dans les différentes fractions à l'aide d'un spectrophotomètre.

La concentration en B-PE est calculée d'après l'équation de Bermejo *et al.* (2002) :

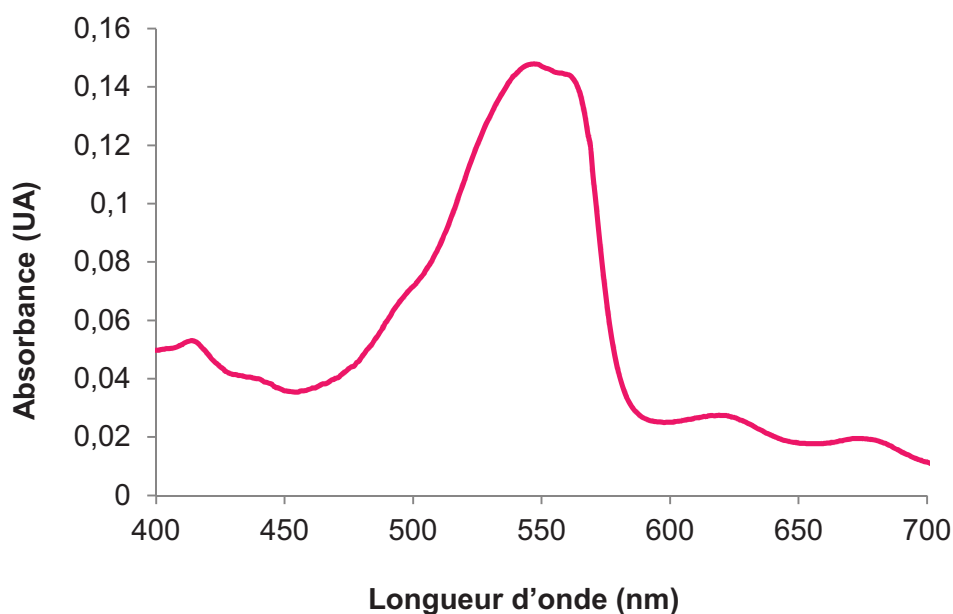
$$[\text{B-PE}] = (A_{565} - 2,8 \times [\text{R-PC}] - 1,34 \times [\text{APC}]) / 12,7$$

$$[\text{R-PC}] = (A_{620} - 0,7 \times A_{650}) / 7,38$$

$$[\text{APC}] = (A_{650} - 0,19 \times A_{620}) / 5,65$$

La BPE présente un spectre différent de la R-PE puisqu'elle présente un double pic à 545 et 565 nm et un épaulement à 498 nm (Glazer 1977 ; Glazer 1982 ; Tchernov *et al.* 1993). Son maximum de fluorescence est de 575 nm (Glazer et Stryer 1990) (Figure 44).





**Figure 44 : spectres d'absorbance et de fluorescence caractéristiques de la B-PE de *Porphyridium cruentum***

L'indice de pureté est calculé selon le ratio :  $A_{545}/A_{280}$ . Il correspond au ratio entre l'absorbance maximale de la B-PE (545 nm) et l'absorbance des protéines totales (280 nm).

#### 4.7. Les sucres hydrosolubles

La teneur en sucres hydrosolubles totaux de l'EB est déterminée par la méthode colorimétrique modifiée de Dubois *et al.* (1956). Les sucres simples, les oligosaccharides, les polysaccharides et leurs dérivés forment du furfural ou de l'hydroxyméthyl furfural lorsqu'on les traite avec du phénol et un acide fort (acide sulfurique concentré). La réaction est sensible et la coloration orangée est stable. On peut ainsi doser les glucides totaux par spectrophotométrie.

Du phénol à 5% (200  $\mu$ L) est déposé dans un tube contenant au préalable 200  $\mu$ L d'échantillon, suivi d'un dépôt de 1 mL d'acide sulfurique concentré. Les tubes sont laissés 10 min à température ambiante avant homogénéisation (10 secondes à 500 x g). Les tubes sont à nouveau laissés 15 min à température ambiante puis sont placés pendant 30 min à 35°C avant mesure de l'absorbance à 490 nm. Le glucose est utilisé comme référence. Une gamme de concentration de 0 à 100 mg/L est réalisée (Figure 45).

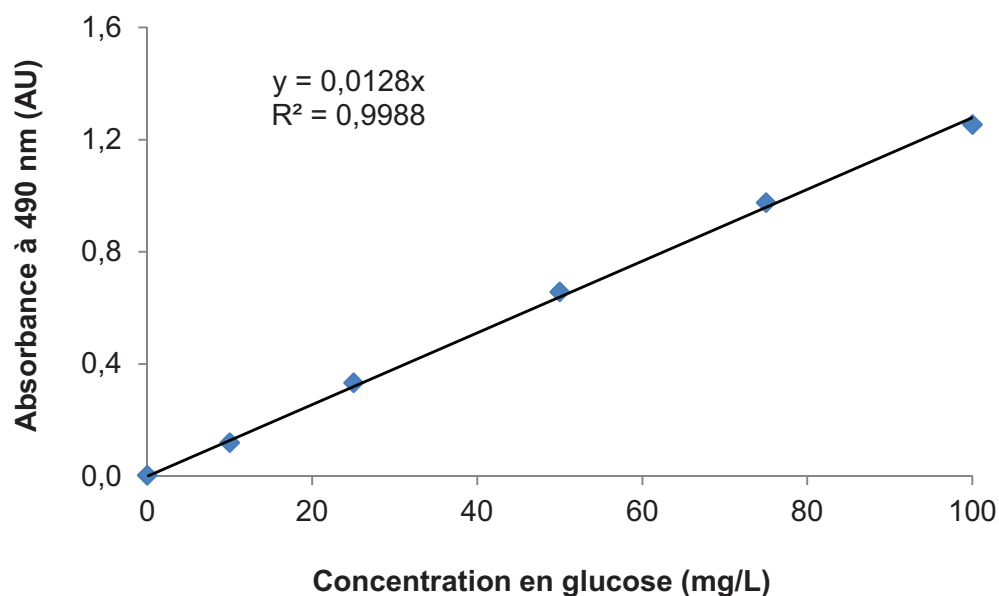


Figure 45 : gamme étalon du dosage des sucres hydrosolubles par la méthode de Dubois

#### 4.8. Les lipides

Les lipides sont extraits selon la méthode de Bligh et Dyer (1959). Cette technique repose sur le principe d'extraction à froid des lipides par un mélange de solvants. L'addition d'une solution de NaCl permet ensuite l'obtention d'un système biphasique permettant alors l'obtention de la phase liposoluble.

Les lipides sont extraits à partir d'algues fraîches avec un mélange de solvants dichlorométhane/méthanol (2/1, v/v). Les algues fraîches (10 g) sont mélangées à du méthanol (25 ml) et broyées à l'ultraturax (20000 t/min). Du dichlorométhane est ensuite ajouté (12,5 mL) et la solution est placée sous agitation pendant 15 min. Du dichlorométhane est à nouveau additionné (12,5 mL) et le mélange est laissé sous agitation toute la nuit. L'extrait est ensuite filtré sur Büchner (Figure 46), et du NaCl (5%) est ajouté au filtrat.

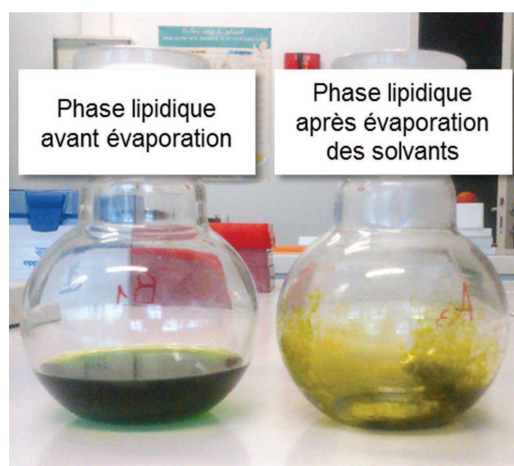


Figure 46: filtration du macérât d'algue sur Buchner



Figure 47 : obtention de la phase liposoluble par décantation

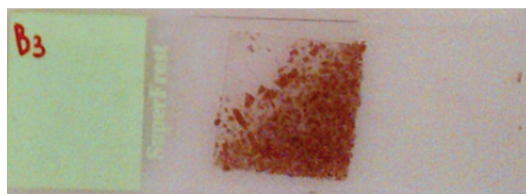
Le filtrat obtenu est ensuite placé dans une ampoule à décanter pendant 1h30 (Figure 47). À l'issue de la séparation de phase, la phase organique (inférieure) est collectée dans un ballon taré puis évaporée à l'évaporateur rotatif (Figure 48). Le contenu lipidique est déterminé ensuite par méthode gravimétrique.



**Figure 48 : phase liposoluble avant et après évaporation des solvants**

## **5. Observation microscopique et détermination de l'épaisseur des thalles**

Afin de déterminer l'épaisseur moyenne des thalles, des sections transversales sont effectuées sur les différents échantillons (algues fraîches) (Gavio et Fredericq 2002). À partir d'une biomasse homogène, trois lames sont préparées (Figure 49).



**Figure 49 : hachis entre lames et lamelles d'algues fraîches**

Huit sections de thalles sont choisies aléatoirement sur les lames et cinq transects sont réalisés sur chaque section de thalle. Des photos microscopiques sont réalisées à l'aide d'un microscope (Olympus AX70/provis) sans coloration et d'une caméra digitale (Dmx 1200F, Nikon, Japon). Celles-ci ont été analysées à l'aide du logiciel Lucia G imaging (Laboratory Imaging, CZ) (Figure 50).



**Figure 50: microscope optique et système d'acquisition utilisés pour la détermination de l'épaisseur des thalles**

## **6. Statistiques et expression des résultats**

Les moyennes et écarts-types sont donnés pour chaque résultat. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SigmaStat 3.0, et par des analyses de variance à un facteur (One-Way ANOVA). Des différences significatives à  $p < 0,05$  entre les échantillons sont déterminées par le test de multicomparaison Student-Newman-Keul's (SNK).

Les matériels et méthodes présentés dans le chapitre précédent ont permis de réaliser les différentes études qui vont vous être présentées dans les chapitres suivants.

Le chapitre qui suit correspond à une étude réalisée dans le but de mettre en évidence une variation de la composition biochimique de l'espèce étudiée, *Grateloupia turuturu*, se développant dans deux sites aux conditions environnementales différentes et également d'identifier les effets des conditions de stockage sur cette composition biochimique.



## **Chapitre III : Variation de la composition biochimique de *Grateloupia turuturu* prélevée sur deux sites d'échantillonnage : Influence de la méthode de stockage sur l'extraction de la R-PE**

### **1. Contexte de l'étude**

*Grateloupia turuturu* est une espèce non indigène de la façade Atlantique Française qui constitue une biomasse importante par son caractère proliférant. Elle possède une capacité d'adaptation qui lui permet de se développer dans de nombreux environnements. La caractérisation biochimique de *Grateloupia turuturu* a pour but de mettre en évidence un possible polymorphisme biochimique de la R-PE différent des autres espèces d'algues rouges, qui pourrait expliquer cette faculté adaptative que possède *Grateloupia turuturu*. De nombreuses études réalisées sur d'autres espèces d'algues montrent clairement que le contenu biochimique varie selon la saison, l'aire géographique ainsi que les conditions environnementales (Ito et Hori 1989). Plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes d'adaptations des algues rouges à long terme (à un niveau cellulaire) par des modifications de l'anatomie du thalle, de la paroi cellulaire et des différences d'organisation du thylakoïde et de la morphologie du chloroplaste (Talarico 1996; Talarico et Maranzana 2000); mais également à court terme au niveau moléculaire, y compris par des altérations de la pigmentation et au niveau de la composition et de la fonctionnalité de la membrane photosynthétique (Dring *et al.* 1996). En 2010, Denis *et al.* ont montré que la composition biochimique de *G. turuturu* présente des variations saisonnières. La teneur en R-PE est plus importante en hiver qu'en été, démontrant ainsi le lien entre l'irradiance et le contenu en pigments photosynthétiques.

Dans ce contexte, l'influence de deux sites de prélèvement sur le contenu biochimique de *G. turuturu* a été étudiée avec l'objectif de compléter les connaissances existantes. Cette étude a été réalisée en 2010, période au cours de laquelle les variables environnementales n'avaient pas été mesurées, il était donc difficile d'établir un lien entre celles-ci et la morphologie et la biochimie de l'algue. La même étude a donc été renouvelée en 2013, période à laquelle les variables environnementales ont été identifiées et mesurées afin d'établir un lien entre le développement de l'algue et ces variables. De plus, l'impact de méthodes de stockage sur l'extraction de la R-PE a également été étudié (au cours de l'étude de 2010).

Les résultats de l'étude menée en 2010 ont fait l'objet d'une publication scientifique qui est présentée en Annexe 1.



## 2. Étude de 2010

### 2.1. Protocole de l'étude

Les thalles de *G. turuturu* ont été collectés le 18 Mai 2010 au cours de la même marée sur deux sites de la zone intertidale de la côte Atlantique, à Le Croisic (47°17'53.5"N-2°32'38.6"O) (A) et à Batz-sur-Mer (47°16'33.2"N-2°29'39.8"O) (B) (Figure 51). Après traitement, les échantillons ont été congelés.

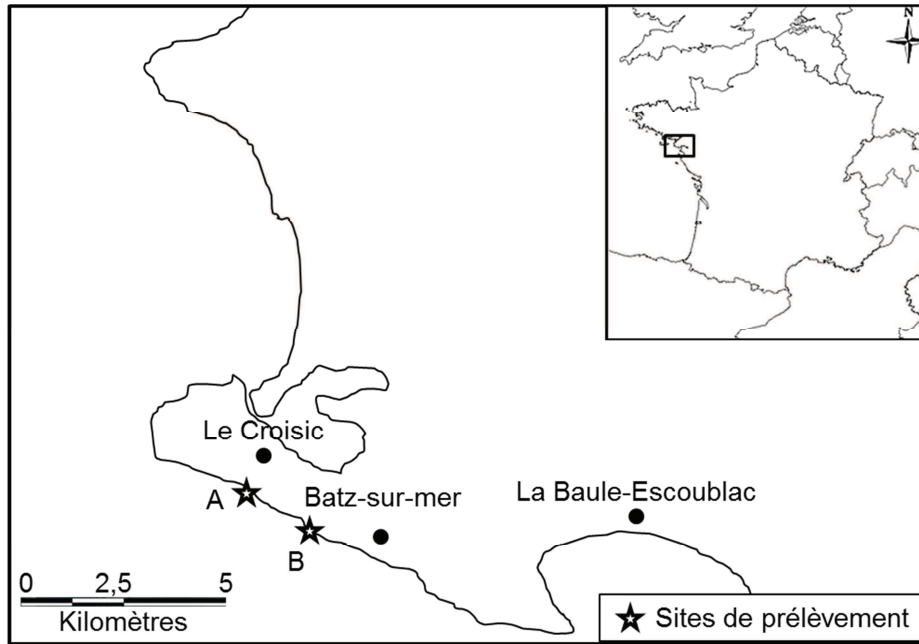


Figure 51 : localisation des deux sites de prélèvement de *Grateloupia turuturu* le long de la côte Atlantique (France)

Pour les deux sites (A et B), une partie des échantillons a été lyophilisée et immédiatement analysée (1). Une autre partie a été lyophilisée et stockée six mois à température ambiante à l'obscurité avant d'être analysée (2). Enfin, une troisième partie a été stockée six mois au congélateur (-20°C) à l'obscurité (3) avant d'être lyophilisée puis analysée (Figure 52).

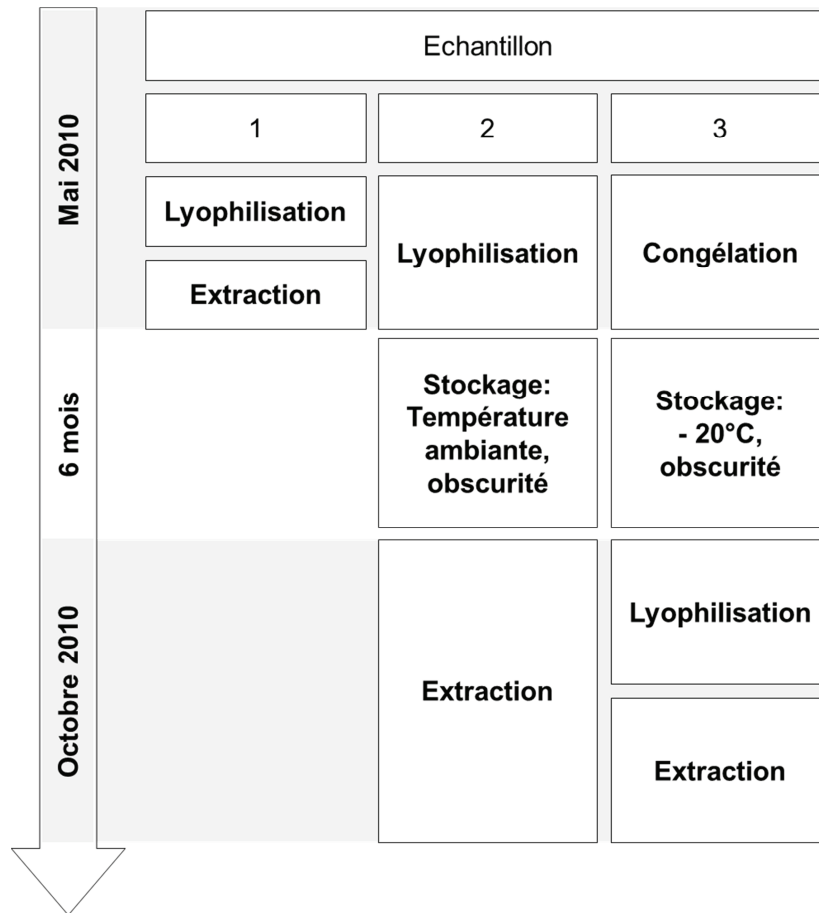


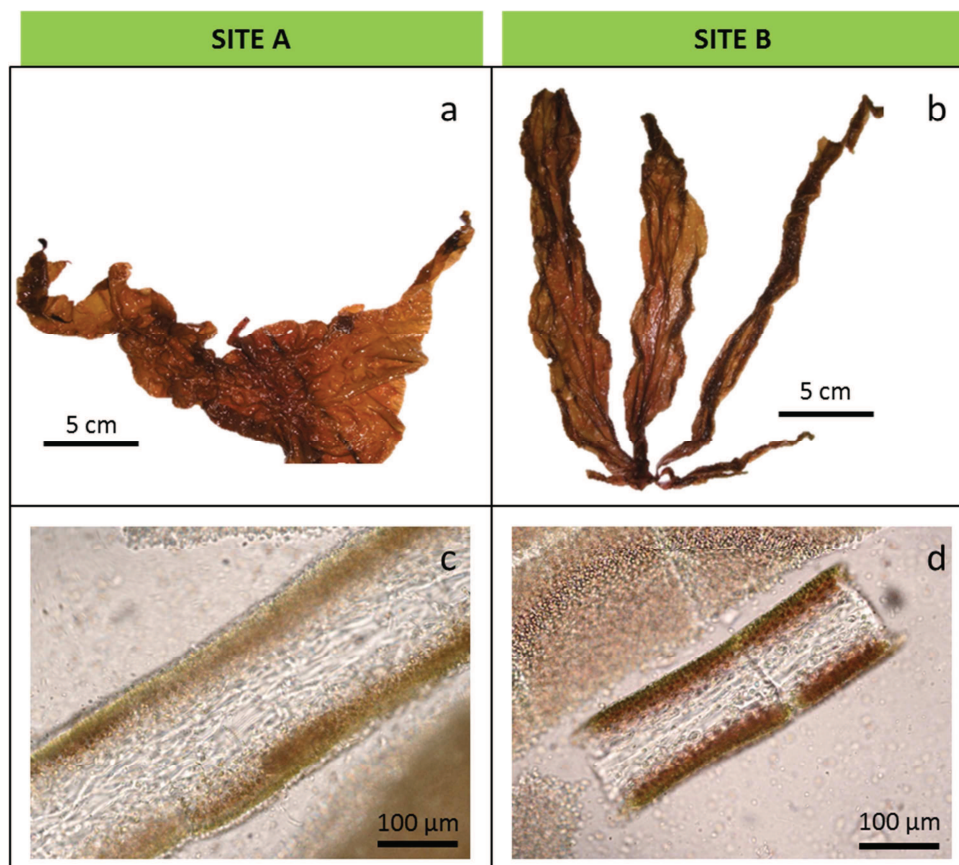
Figure 52 : protocole d'échantillonnage et de la méthode de stockage

Pour chaque échantillon une extraction a été réalisée selon la méthode décrite dans le Chapitre II, paragraphe 2.1. Sur le plan biochimique, les extraits bruts (EB) obtenus ont été analysés : rendement en R-PE, sucres hydrosolubles, protéines hydrosolubles, protéines totales, lipides, cendres et matière sèche ont été déterminés et les EB ont été précipités par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium (voir Chapitre II, paragraphe 2.2). Sur le plan biologique, des observations macroscopiques ont été réalisées et des coupes transversales ont été effectuées sur les thalles des différents échantillons afin d'en déterminer l'épaisseur.

## 2.2. Résultats et discussion

### 2.2.1. Comparaison des sites d'échantillonnage

La Figure 53 montre les différences morphologiques entre les thalles issus des deux sites de prélèvement en terme de taille, de forme, de coloration et d'apparence (observations de l'expérimentateur). Des différences visibles au niveau du matériel biologique ont été constatées. Alors que les thalles issus du site A sont épais, larges et de formes variées, marrons et de faible viscosité, ceux issus du site B sont longs et fins, foliacés, rouges et très visqueux (présence de mousse lors du lavage des prélèvements).



**Figure 53 : thalles de *Grateloupia turuturu* collectés à partir des deux sites d'échantillonnage A et B. (a) Observation morphologique d'un thalle issu du site A. (b) Observation morphologique d'un thalle issu du site B. (c) Coupe transversale d'un thalle issu du site A. (d) Coupe transversale d'un thalle issu du site B**

Ces observations sont résumées dans le Tableau IX. La différence d'épaisseur a été confirmée grâce aux coupes transversales présentées dans la Figure 53 (c) et la Figure 53 (d). Grâce au logiciel LuciaGimaging, l'épaisseur moyenne des thalles a été déterminée à  $239 \pm 41 \mu\text{m}$  (Tableau IX) pour les échantillons du site A et à  $136 \pm 17 \mu\text{m}$  (Tableau IX) pour les échantillons du site B. Ces résultats sont significativement différents ( $p < 5\%$ ) et

confirment ainsi les différences morphologiques observées entre les échantillons des deux sites. Ces résultats sont en accord avec les mesures obtenues dans l'étude de Barbara et Cremades en 2004. En effet, cette étude a déterminé que l'épaisseur des thalles de *Grateloupia turuturu* varie entre 130 et 250  $\mu\text{m}$ , ce qui correspond aux épaisseurs déterminées pour les échantillons des sites A et B.

**Tableau IX : aspects morphologiques et composition biochimique d'échantillons de *G. turuturu* issus des sites de prélèvement des sites A et B**

Site	A	B
Apparence du thalle	Epais, faible viscosité, marron-verdâtre	Fins, forte viscosité, marron-rouge
Epaisseur moyenne des thalles ( $\mu\text{m}$ )	239 $\pm$ 41	136 $\pm$ 17*
% <b>cortex</b> <sup>43</sup>	46 $\pm$ 8	48 $\pm$ 9
% <b>medulla</b> <sup>44</sup>	54 $\pm$ 8	52 $\pm$ 9
Protéines totales ( $\text{mg.g}^{-1}$ MS)	161,58 $\pm$ 5,66	217,75 $\pm$ 19,72*
Protéines hydrosolubles ( $\text{mg.g}^{-1}$ MS)	7,19 $\pm$ 0,74	19,15 $\pm$ 0,47*
R-PE ( $\text{mg.g}^{-1}$ MS)	1,16 $\pm$ 0,33	4,39 $\pm$ 0,15*
Lipides ( $\text{mg.g}^{-1}$ MS)	28,07 $\pm$ 5,12	54,35 $\pm$ 2,05*
Sucres hydrosolubles ( $\text{mg.g}^{-1}$ MS)	16,05 $\pm$ 0,82	41,57 $\pm$ 0,66*
Poids sec ( $\text{mg.g}^{-1}$ MS)	127,68 $\pm$ 7,31	64,61 $\pm$ 11,06*
Cendres ( $\text{mg.g}^{-1}$ MS)	144,42 $\pm$ 1,75	155,86 $\pm$ 2,58*

NB : \* résultats significativement différents avec  $p < 5\%$ .

Ainsi il semble y avoir une corrélation entre morphologie du thalle et caractéristiques environnementales du site d'échantillonnage. Ces paramètres écologiques n'ont pas été déterminés durant cette étude, ainsi une autre étude est nécessaire afin de mesurer ces différents paramètres comme la salinité, l'hydrodynamisme, le pH, la température, etc., afin de valider cette hypothèse. L'étude de 2013 a permis de réaliser ces mesures environnementales et est présentée ci-après. La différence observée peut également être due à la présence de populations génétiques distinctes sur les sites étudiés et, dans ce cas, une détermination génétique de chaque échantillon devrait être réalisée dans le futur.

Ces différences entre échantillons ont également été observées pendant l'étape de lavage. En effet, les échantillons du site B ont donné une eau de lavage rose et moussante indiquant une haute solubilité de la R-PE et un relargage des composés hydrosolubles par

<sup>43</sup> Partie anatomique périphérique d'un organisme.

<sup>44</sup> Partie qui se trouve au centre d'un organisme.

choc osmotique. Cela n'a pas été le cas avec les échantillons du site A, qui ont également été caractérisés par des extraits hautement visqueux. C'est la première fois que ce phénomène a été rapporté pour cette espèce.

En ce qui concerne la composition biochimique, la teneur en protéines totales ( $217,75 \pm 19,72 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ ) des échantillons du site B (Tableau IX) est proche de celle déterminée pour des échantillons de *G. turuturu* prélevés en Mai 2006 ( $203,1 \pm 19,7 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ ) par Denis *et al.* en 2010 et en 1984 par Fujiwara-Arasaki *et al.* avec une teneur en protéines totales d'environ  $200 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ . Cependant, la teneur en protéines totales des échantillons du site A ( $161,58 \pm 5,66 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ ) (Tableau IX) est plus faible que les valeurs rapportées précédemment mais aussi que celle décrite pour *Palmaria palmata* ( $220 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ ) (Galland-Irmouli *et al.* 1999). En 2010, Denis *et al.* ont montré que la teneur en protéines de *G. turuturu* est sujette à de grandes variations durant l'année avec une concentration maximale de  $300 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$  mesurée en hiver et un minimum de  $150 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$  au cours des mois de Juillet et Août. Notre étude rapporte pour la première fois un effet du site de prélèvement sur la teneur en protéines totales. En ce qui concerne les protéines hydrosolubles, les échantillons du site B sont également plus riches ( $19,15 \pm 0,47 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ ) que ceux du site A ( $7,19 \pm 0,74 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ ). Une précédente étude, utilisant le même protocole d'extraction présenté ici, a montré que la teneur en protéines hydrosolubles d'échantillons de *G. turuturu* issus d'un autre site de prélèvement (localisé à Piriac sur Mer, proche des sites A et B) était de  $9,4 \pm 2,0 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$  (Denis *et al.* 2009a), confirmant ainsi que la teneur en protéines hydrosolubles varie également selon le site d'échantillonnage et peut différer selon la population génétique concernée. Cette dernière hypothèse devra être vérifiée par une prochaine étude sur la détermination génétique des populations de *G. turuturu* sur la côte Bretonne. Pour ce qui est de la teneur en sucres hydrosolubles, les échantillons du site B ( $41,57 \pm 0,66 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ ) apparaissent plus riches que ceux du site A ( $16,05 \pm 0,82 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ ) (Tableau IX). Il a précédemment été démontré que la teneur en sucres hydrosolubles dans cette algue est de  $24,0 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$  (Denis *et al.* 2009a), valeur en concordance avec celles obtenues dans notre présente étude. Ces observations suggèrent que les sucres hydrosolubles (plus élevés dans le site B) n'empêchent pas l'extraction des protéines solubles (8,8% des protéines totales extraites au lieu de 4,4% pour les échantillons du site A) (Tableau IX). Le contenu en lipides est également significativement différent dans ces échantillons :  $28,07 \pm 5,12 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$  pour le site A et  $54,35 \pm 2,05 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$  pour le site B. En 2010, Denis *et al.* ont montré qu'il n'y avait pas de différences significatives dans la teneur en lipides totaux à travers l'année. De même en 2013, Kendel *et al.* ont confirmé cette observation et ont déterminé une teneur moyenne de  $36 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$  en lipides totaux. Les présents résultats démontrent qu'il existe des variations entre les échantillons prélevés

dans des sites différents. Ces valeurs sont plus élevées que celles mesurées pour *P. palmata* (15,7 mg.g<sup>-1</sup> MS) ou pour *Chondrus crispus* (6,1 mg.g<sup>-1</sup> MS). La valeur obtenue pour les échantillons de *G. turuturu* issus du site A est proche de celle rapportée pour une autre espèce d'algue rouge, *Porphyra umbilicalis* (33,7 mg.g<sup>-1</sup> MS) (Fleurence *et al.* 1994).

Comme cité précédemment, la composition en protéines, en sucres hydrosolubles et en lipides, varie selon le site étudié. En ce qui concerne la R-PE, la teneur la plus élevée a été mesurée pour les échantillons du site B (Tableau IX). Ceci est cohérent avec les résultats précédents obtenus pour la teneur en protéines totales et en protéines hydrosolubles et qui sont également les plus élevés pour les échantillons du site B. La différence en rendement de R-PE entre les échantillons des sites A et B peut aussi s'expliquer par la difficulté d'extraction de la R-PE des échantillons issus du site A. Les variations en rendement de R-PE sont comparables à celles des protéines totales, avec une valeur plus élevée dans le site B (4,39 ± 0,15 mg.g<sup>-1</sup> MS) que dans le site A (1,16 ± 0,33 mg.g<sup>-1</sup> MS) (Tableau IX). Cette valeur est proche de celle mesurée dans l'étude de Denis *et al.* (2010) (3,0 ± 0,3 mg.g<sup>-1</sup> MS). Pour le site A, le rendement en R-PE (1,16 ± 0,33 mg.g<sup>-1</sup> MS) est plus faible que dans l'étude de Denis *et al.* (2010), mais ceci concorde avec les résultats des teneurs en protéines totales.

**Tableau X : indices de pureté (IP) et rendement en R-PE des extraits bruts (EB) et des extraits protéiques (EP) des échantillons des sites A et B suivant les trois méthodes de stockage**

Site A						
Mode de stockage	1		2		3	
Fractions	A1 EB	A1 EP	A2 EB	A2 EP	A3 EB	A3 EP
IP ( $A_{565nm}/A_{280nm}$ )	0,22 ± 0,00	0,49 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,27 ± 0,01
Rendement R-PE ( $\times 10^{-2}$ mg.g <sup>-1</sup> MS)	115,21 ± 0,75	74,42 ± 0,43	50,03 ± 2,13	31,61 ± 0,75	71,50 ± 1,14	40,01 ± 0,78
Site B						
Mode de stockage	1		2		3	
Fractions	B1 EB	B1 EP	B2 EB	B2 EP	B3 EB	B3 EP
IP ( $A_{565nm}/A_{280nm}$ )	0,76 ± 0,01	0,93 ± 0,03	0,48 ± 0,01	0,57 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0,78 ± 0,01
Rendement R-PE ( $\times 10^{-2}$ mg.g <sup>-1</sup> MS)	408,34 ± 4,08	264,56 ± 2,08	215,38 ± 15,05	182,19 ± 6,47	364,32 ± 20,02	254,78 ± 7,67

Le rendement en R-PE et l'IP sont significativement plus faibles ( $115,21 \pm 0,75 \times 10^{-2}$  mg.g<sup>-1</sup> MS et  $0,22 \pm 0,00$  respectivement) dans les échantillons du site A (A1 EB) que dans ceux du site B (B1 EB) ( $408,34 \pm 4,08 \times 10^{-2}$  mg.g<sup>-1</sup> MS et  $0,76 \pm 0,01$  respectivement) (Tableaux IX et X). De plus, en ce qui concerne les extraits protéiques du site B, la précipitation à 85% de sulfate d'ammonium conduit à un surnageant incolore et a un culot rougeâtre-rose pour lequel l'IP augmente de  $0,76 \pm 0,01$  pour B1 EB à  $0,93 \pm 0,03$  pour B1 EP (résultats significativement différents avec  $p < 5\%$ ). Cette étape de fractionnement permet d'augmenter la concentration de la R-PE d'un facteur d'environ 1,22 en comparaison avec le cas précédent. Pour tous les échantillons des sites A et B, la précipitation à 85% de sulfate d'ammonium entraîne une augmentation de l'IP et une diminution du rendement, cependant cette étape est contraignante en ce qui concerne les échantillons du site B. Les différentes valeurs de rendement et d'IP entre les échantillons des sites A et B (Tableau X) et les différences spectrales (Figure 54) montrent que les échantillons étudiés ici réagissent différemment au protocole d'extraction, et que d'autres paramètres interfèrent avec ce protocole. Cette étape correspond à une étape de pré-purification qui doit être adaptée selon la biomasse.



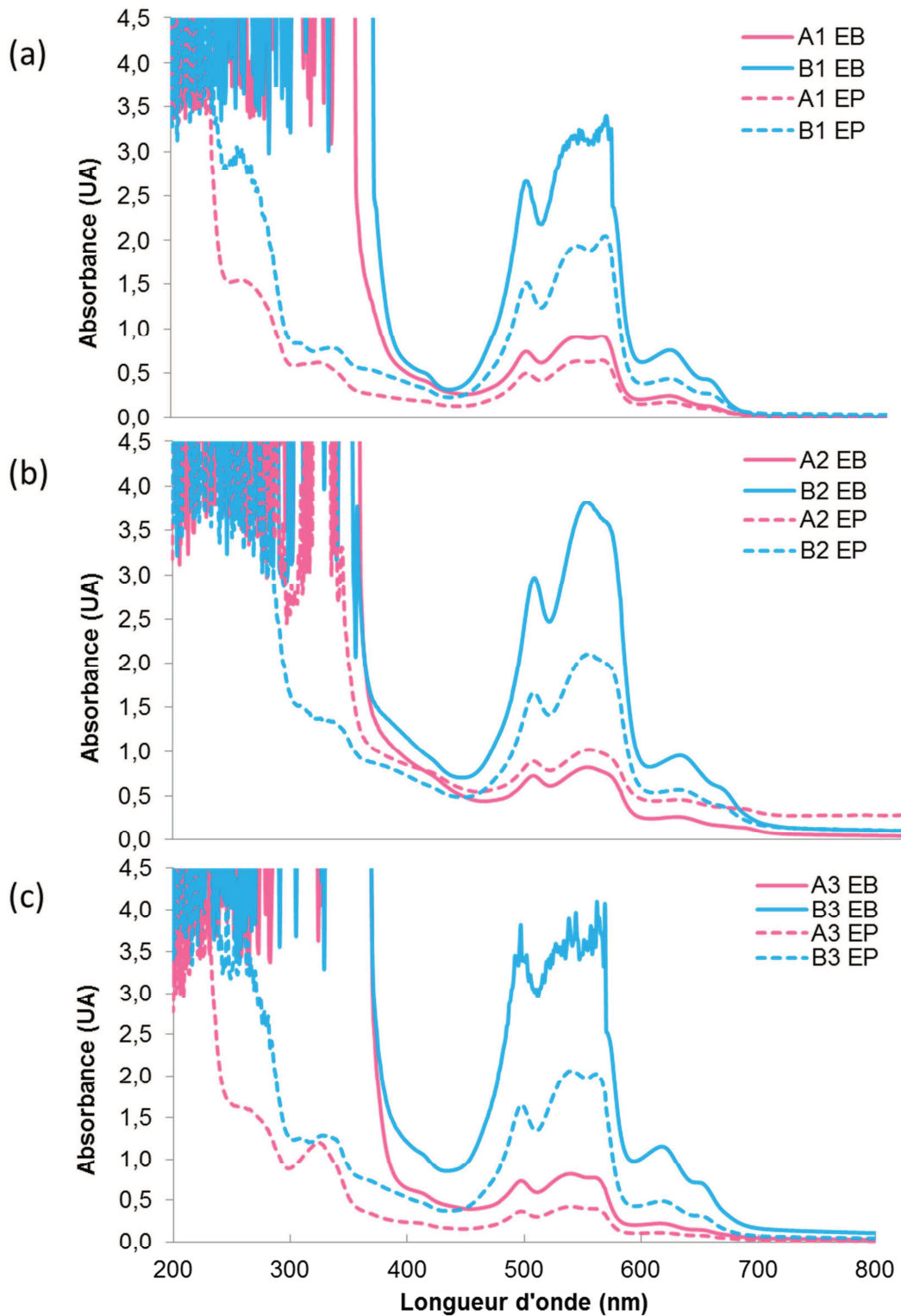


Figure 54 : spectres d'absorbance des EB et des EP de R-PE de *G. turuturu*. Comparaison des méthodes de stockage pour les trois échantillons. (a) aucun stockage ; (b) stockage pendant six mois à température ambiante à l'obscurité ; (c) stockage pendant six mois à -20°C à l'obscurité (3), des deux sites de prélèvement A (rose) et B (bleu)

Comme noté précédemment, de fortes différences au niveau de la teneur en R-PE ont été constatées entre les différents sites de prélèvement. Certaines hypothèses peuvent expliquer ces résultats. En effet, plusieurs auteurs ont déjà montré une augmentation de la densité de population algale induite par un facteur environnemental: l'hydrodynamisme (Van den Hoek 1978; Stiger et Payri 1999). Plouguerné (2006) a rapporté que d'autres facteurs, comme la température de l'eau de mer et la salinité, sont impliqués dans le recrutement de *G. turuturu* et par conséquent peuvent avoir un impact à un niveau biochimique. Une étude de 2008 a montré qu'il n'y a pas de variations annuelles de la teneur en R-PE de *Porphyra umbilicalis* entre des algues immergées et les algues émergées au cours de la marée (6 heures d'émersion), excepté au mois de Mai où il y a une différence significative entre les algues émergées dont la teneur en R-PE est plus importante que pour les algues immergées (Sampath-Wiley *et al.* 2008). De plus, dans l'étude menée sur les variations saisonnières de *G. turuturu*, Denis *et al.* (2010) ont suggéré que la meilleure période de récolte de cette espèce pour l'extraction de la R-PE s'étend de Février à Juin. Les variations saisonnières ont un impact au niveau biochimique, ainsi la lumière et la température de l'eau de mer sont deux facteurs majeurs induisant des modifications du contenu biochimique. Dans notre présente étude, seulement 21% du poids sec a été évalué pour les échantillons du site A alors qu'environ 40% ont été évalués pour le site B. Ceci signifie que la matière non évaluée est composée essentiellement de fibres (sucres insolubles), lesquels entrent pour la plupart dans la structure de la paroi cellulaire. Cette différence peut peut-être expliquer la difficulté à extraire la R-PE des échantillons issus du site A. Les spectres des EB (Figure 54) confirment ces différences entre les échantillons des sites A et B. En effet, en utilisant le même protocole d'extraction, l'absorbance à 565 nm est cinq fois plus importante dans le site B que dans le site A.

### 2.2.2. Comparaison des méthodes de stockage

Pour étudier l'impact des méthodes de stockage sur les rendements d'extraction de la R-PE et l'indice de pureté, les trois méthodes suivantes ont été comparées : (1) pas de stockage, (2) algues lyophilisées stockées pendant six mois à température ambiante, et (3) algues congelées stockées six mois à -20°C. La procédure est résumée dans la Figure 52. Après avoir démontré que les deux sites de prélèvement présentent des différences au niveau des rendements d'extraction de la R-PE, la partie de ce travail a été également réalisée pour les deux sites (Tableau X). Dans les deux cas, les meilleurs résultats en termes de rendement et d'IP sont obtenus quand les échantillons sont analysés directement après récolte. Le stockage à température ambiante d'algues lyophilisées pendant six mois (méthode 2) présente les plus faibles rendements ( $50,03 \pm 2,13 \times 10^{-2} \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$  pour le site A et  $215,38$

$\pm 15,05 \times 10^{-2} \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$  pour le site B) et IP ( $0,12 \pm 0,03$  et  $0,48 \pm 0,01$  respectivement). Ceci est confirmé par les spectres (Figure 54 (b)), pour lesquels le pic à 565 nm n'est pas présent, reflétant ainsi une détérioration de la R-PE dans le temps. Le stockage par congélation (méthode 3) donne de meilleurs résultats. En effet, le rendement d'extraction en R-PE de l'échantillon B3 EB ( $364,32 \pm 20,02 \times 10^{-2} \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ ) est élevé et significativement différent de celui obtenu pour l'échantillon B2 EB, il en est de même pour l'IP ( $0,70 \pm 0,01$  et  $0,48 \pm 0,01$  respectivement). Ainsi, la congélation permet une meilleure préservation de la biomasse que le stockage à température ambiante (Tableau X). La méthode de stockage et la durée de stockage semblent avoir un impact sur la qualité de la biomasse. Pour un stockage à long terme, basé sur le rendement et la pureté de la R-PE, la meilleure méthode de préservation est la congélation d'algues fraîches (Kaas 1998).

Le site d'échantillonnage et les conditions de stockage des échantillons sont deux facteurs importants qui vont affecter l'extraction et ainsi le rendement en R-PE. Afin d'optimiser l'extraction de ce pigment de haute valeur ajoutée, il est nécessaire d'utiliser une biomasse standardisée pour laquelle les paramètres environnementaux sont connus mais il est aussi nécessaire d'optimiser les conditions de stockage afin d'augmenter le rendement d'extraction de la R-PE.

### 3. Étude de 2013

#### 3.1. Protocole de l'étude

Les mêmes analyses biologiques et morphologiques ont été effectuées sur des prélèvements réalisés le 10/05/2013 sur les deux zones d'études présentées en Figure 51. Les variables environnementales ont été prises en compte au cours de cette présente étude. De plus, la longueur et largeur des thalles ont été mesurées, ce qui n'avait pas été fait en 2010.

##### 3.1.1. Caractérisation des sites de prélèvement

Les superficies ont été déterminées. Les facteurs abiotiques pris en compte dans cette étude sont la salinité, le pH, la bathymétrie, la température de l'eau, l'ensoleillement et l'hydrodynamisme. Les facteurs biotiques n'ont pas été étudiés.

##### 3.1.2. Caractéristiques morphologiques de *Grateloupia turuturu*

En ce qui concerne les mesures de thalles, seuls ceux de taille supérieure à 10 cm ont été mesurés. Au niveau de chaque site, trois quadrats de  $0,25 \text{ m}^2$  ( $50 \times 50 \text{ cm}$ ) ont été choisis au hasard lors de la marée basse. Dans le cas où le recouvrement était de 100%, seulement un

quart de l'aire du quadrat (0,0625 m<sup>2</sup>) a été échantillonné, dans le cas contraire (recouvrement <100%), la totalité des thalles a été collectée. Après récolte, la mesure des thalles (longueur et largeur) a été réalisée au laboratoire. Ce protocole d'échantillonnage a été réalisé trois fois afin de suivre les variations morphologiques de *Grateloupia turuturu*: le 25/04/13, le 10/05/13 et le 23/05/13. Il a été réalisé à partir de l'étude de Araujo *et al.* (2011)

De plus, comme en 2010, une estimation de l'épaisseur moyenne des thalles a été effectuée sur les échantillons provenant des deux sites.

### 3.1.3. Caractéristiques biochimiques de *Grateloupia turuturu*

De même qu'en 2010, une caractérisation biochimique a été effectuée afin de doser la teneur en protéines totales, lipides, sucres hydrosolubles, protéines hydrosolubles, R-PE, cendres et matière sèche des algues issues des deux sites d'étude.

## 3.2. Résultats et discussion

### 3.2.1. Caractérisation des sites de prélèvement

Les deux sites sont structurellement différents. En effet, le site A est une cuvette fermée tandis que le site B est une mare plus ouverte constituant un passage pour l'eau s'écoulant du sable, ce qui est beaucoup plus atténué dans le site A. Ils présentent des superficies différentes. En effet, le site A est une cuvette fermée de 116 m<sup>2</sup> constituant ainsi un milieu clos tandis que le site B est une vaste zone ouverte de 320 m<sup>2</sup>.

Les mesures des diverses variables environnementales effectuées au niveau des deux sites de prélèvements sont présentées dans le Tableau XI.

**Tableau XI : mesures de salinité, de pH, de température de l'eau et de bathymétrie relevées dans les deux sites**

Site	A	B
Salinité (‰) (n = 3)	36,7 ± 2,1	36,4 ± 0,2
pH (n = 3)	7,9 ± 0,7	8,1 ± 0,5
Température de l'eau (°C) (n = 30)	12,3 ± 0,13	12,6 ± 0,09
Bathymétrie (cm) (n = 30)		
Moyenne ± écart-type	23,55 ± 10,16	16,35 ± 7,28*
Maximum	44	33
Minimum	8	6
Etendue de variation	36	27

NB : \* résultats significativement différents avec  $p < 5\%$ .

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les sites A et B, aussi bien au niveau du pH que de la salinité. Il est à noter que la mare A présente des écarts de salinité plus importants que la mare B. Il en est de même pour la température de l'eau. Ces observations peuvent s'expliquer par le fait que les deux zones d'études soient proches et situées dans la même zone littorale. Ces facteurs abiotiques ne semblent pas être à prendre en compte dans l'influence de l'environnement sur le développement de l'algue.

Le seul paramètre mesuré présentant une différence significative, est la bathymétrie. En effet, le Tableau XI montre que la profondeur moyenne du site A (23,55 ± 10,16 cm) est statistiquement différente ( $p < 5\%$ ) et plus importante que celle du site B (16,35 ± 7,28 cm). De plus, l'étendue de variation est plus élevée au niveau du site A (36 cm) qu'au niveau de B (27 cm) traduisant alors une plus grande homogénéité de la profondeur dans le site B. Ainsi ce facteur peut être un facteur intervenant dans les différences observées entre les thalles des sites A et B.

L'ensoleillement a également été comparé entre les années 2010 et 2013 (Figure 55). Ces cartes permettent de voir qu'en 2010, l'ensoleillement était de 30 à 40% supérieur à la moyenne alors qu'en 2013 il s'est avéré être de 0 à 10% inférieur à la moyenne. Ces différences sont importantes à prendre en compte sur le développement de l'algue. De plus, l'ensoleillement observé au printemps 2013 est particulièrement bas également par rapport aux années 2011 et 2012.

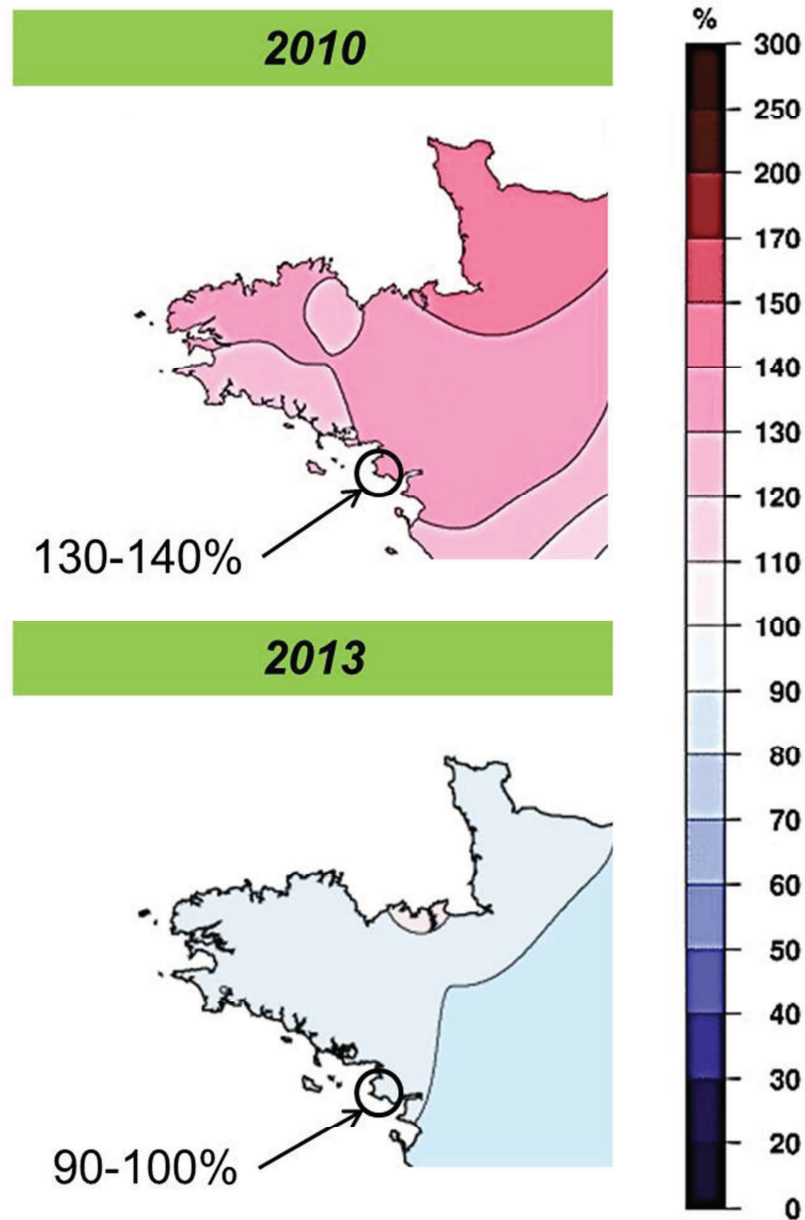


Figure 55 : durée d'ensoleillement aux printemps 2010 et 2013 de la zone d'étude par rapport à la moyenne de référence (1991-2010) (Archives Météo France)

Au cours de ces années, d'autres prélèvements ont été effectués pour le reste de ce travail, et la biomasse présente au cours des années 2011 et 2012 était relativement importante au printemps, principalement dans le site B, ce qui n'a pas été observé au printemps 2013. En effet, le site B était nettement moins riche en biomasse que les années précédentes (Figure 56). Ceci est principalement dû aux conditions climatiques particulièrement mauvaises en 2013.





**Figure 56 : comparaison de la biomasse disponible aux mois de Mai 2010 et 2013 au niveau du site B (même zone photographiée)**

Un autre paramètre observé est l'hydrodynamisme qui est variable entre les deux zones d'études. En effet, à marée basse, lorsque les deux mares sont découvertes, le site A est complètement fermé tandis que le site B est ouvert par un faible courant circulant du sable vers la mer. Leur position géographique dans la zone médiolittorale est la différence majeure. En effet, lors du **flot**<sup>45</sup> ou du **jusant**<sup>46</sup>, le site B est plus longuement en contact avec la mer et donc avec tous les éléments nutritifs, du fait qu'il se situe plus bas dans l'estran. Les algues du site B sont donc soumises aux mouvements d'eau pendant un délai plus long.

Enfin, le dernier paramètre à prendre en compte est la compétition interspécifique. Il a été constaté que le site A était colonisé par plusieurs espèces telles que *Ulva rigida*, *Chondrus crispus* et *Himanthalia sp.* et de nombreux déchets biologiques, notamment des stipes de Laminaires tandis que seuls quelques spécimens de *Chondrus crispus* ont été observés dans le site B. Ceci traduit une plus grande diversité spécifique dans le site A que dans le site B. Bien que ce facteur n'ai pu être évalué de manière rigoureuse, par faute de moyens humains, il est aisé de faire l'hypothèse d'une compétition pour l'accession aux nutriments plus forte dans le site A que dans le site B.

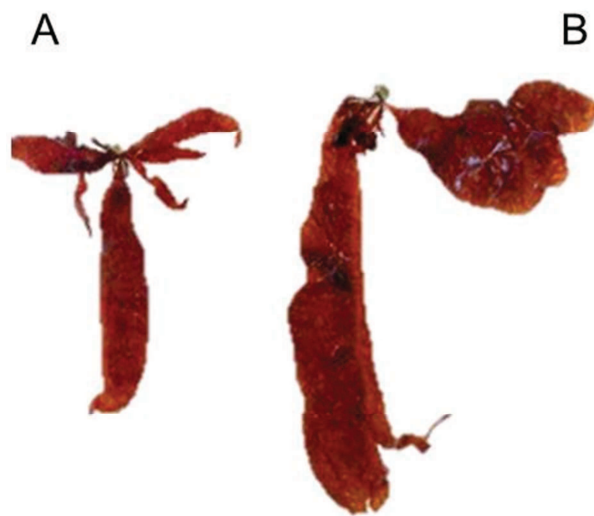
<sup>45</sup> Courant de marée qui commence à basse mer (s'oppose à jusant).

<sup>46</sup> Courant de marée qui commence à haute mer (s'oppose à flot).



### 3.2.1. Caractéristiques morphologiques de *Grateloupia turuturu*

Sur le plan biologique, tout comme en 2010, les thalles qui se développent dans le site B sont nettement plus visqueux que ceux du site A. De même, au toucher, une différence d'épaisseur est notable. En ce qui concerne la forme, les thalles du site B sont beaucoup plus homogènes que ceux du site A. La Figure 57 présente deux thalles collectés sur les deux sites de prélèvements. Les thalles du site B sont globalement plus longs que ceux du site A. Afin de confirmer cette observation, la longueur et la largeur moyenne des thalles ont été mesurées.



**Figure 57 : thalles de *Grateloupia turuturu* prélevés sur les deux sites (à gauche : site A, à droite : site B)**

En ce qui concerne les mesures de longueur et de largeur des thalles, les prélèvements effectués au sein des quadrats au cours des trois sorties, ont conduit à la mesure de 354 et 394 thalles pour les sites A et B respectivement (Tableau XII).

**Tableau XII : longueur et largeur moyennes mesurées au niveau des sites A et B**

Site	A	B
Longueur (cm)	14,9 ± 0,6	17,2 ± 0,7 *
Largeur (cm)	2,9 ± 0,1	3,3 ± 0,1*

NB : \* résultats significativement différents avec  $p < 5\%$ .

Ainsi d'après le Tableau XII, il y a bien une différence significative au niveau de la taille des thalles entre les sites A et B. En effet, ceux se développant dans le site A sont plus courts (14,9 ± 0,6 cm) et plus étroits (2,9 ± 0,1 cm) que ceux se développant dans le site B (17,2 ± 0,7 cm et 3,3 ± 0,1 cm respectivement).

De même que pour l'étude effectuée en 2010, l'épaisseur moyenne des thalles a été déterminée. Les résultats sont présentés dans le Tableau XIII.

**Tableau XIII : épaisseurs moyennes, % de cortex et de médulla mesurés pour les thalles prélevés sur les sites A et B**

Site	A	B
Epaisseur ( $\mu\text{m}$ )	237 $\pm$ 60	181 $\pm$ 47 *
% cortex	38 $\pm$ 0,9	39 $\pm$ 0,9
% médulla	62 $\pm$ 0,9	61 $\pm$ 0,9

NB : \* résultats significativement différents avec  $p < 5\%$ .

Tout comme en 2010, les thalles du site A sont plus épais (237  $\pm$  60  $\mu\text{m}$ ) que ceux du site B (181  $\pm$  47  $\mu\text{m}$ ). Les valeurs obtenues au cours de cette étude sont proches de celles obtenues en 2010 pour les sites A et B (239  $\pm$  41  $\mu\text{m}$  et 136  $\pm$  17 respectivement) (Tableau IX).

À la suite de ces observations, des hypothèses entre les caractéristiques des sites de prélèvements et la morphologie des thalles peuvent être envisagées. Les paramètres pouvant jouer sur des différences de taille et d'épaisseur sont l'hydrodynamisme et/ou la compétition interspécifique. En effet, l'apport nutritif provenant des vagues est plus important dans B que dans A et la compétition interspécifique plus élevée dans le site A que dans le site B. Ces observations peuvent expliquer le développement plus important de la biomasse dans le site B que dans le A, et les différences d'épaisseur et de taille constatées. Il serait donc intéressant dans de futures études de caractériser les éléments nutritifs présents sur les deux sites de façon à pouvoir les comparer *in fine*.

### 3.2.1. Caractéristiques biochimiques de *Grateloupia turuturu*

La Tableau XIV présente la composition biochimique des thalles de *Grateloupia turuturu* pour les deux sites d'étude.

**Tableau XIV : composition biochimique d'échantillons de *G. turuturu* issus des sites de prélèvement A et B (10/05/2013)**

Site	A	B
Protéines totales (mg.g <sup>-1</sup> MS)	220,21 ± 2,53	274,17 ± 13,37 *
Protéines hydrosolubles (mg.g <sup>-1</sup> MS)	18,98 ± 1,22	35,86 ± 2,58 *
R-PE (mg.g <sup>-1</sup> MS)	3,04 ± 0,06	4,05 ± 0,08 *
Lipides (mg.g <sup>-1</sup> MS)	27,41 ± 1,10	44,34 ± 2,23 *
Sucres hydrosolubles (mg.g <sup>-1</sup> MS)	54,12 ± 6,99	70,23 ± 4,39 *
Poids sec (mg.g <sup>-1</sup> MF)	145,19 ± 8,49	96,64 ± 14,78 *
Cendres (mg.g <sup>-1</sup> MS)	296,91 ± 12,88	352,64 ± 4,04 *

NB : \* résultats significativement différents avec  $p < 5\%$ .

Tout comme en 2010, la composition biochimique des thalles diffère entre ceux du site A et ceux du site B. Les algues des deux sites contiennent majoritairement des cendres, des protéines, puis des sucres hydrosolubles, des lipides et enfin des protéines hydrosolubles.

Cependant, par rapport à 2010, des différences sont observées notamment en ce qui concerne la matière sèche qui est plus importante en 2013 qu'en 2010. Il en est de même pour la teneur en cendres, en sucres, en protéines hydrosolubles et en protéines totales. Ainsi, le paramètre environnemental pouvant être à l'origine de ces différences est la durée d'ensoleillement. En effet, comme il a été montré précédemment, la durée d'ensoleillement en 2010 était de 30 à 40% supérieure à la moyenne tandis qu'en 2010 elle était de 0 à 10% inférieure à la moyenne. Les conditions climatiques particulièrement mauvaises en 2013 peuvent être à l'origine de ces différences observées. L'ensoleillement est étroitement lié à la profondeur. L'eau agissant comme un filtre, les algues du site A, zone plus profonde et où la compétition interspécifique est plus importante, auront accès plus difficilement à l'énergie lumineuse que celles du site B qui se développent plus en surface. La photopériode a donc un impact sur la composition biochimique de *Grateloupia turuturu*.

La teneur en protéines hydrosolubles des thalles du site B ( $35,86 \pm 2,58 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ ) est près de deux fois plus importante que celle de A ( $18,98 \pm 1,22 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$ ). Ces différences sont certainement dues aux conditions environnementales comme, l'apport nutritif plus important et la compétition interspécifique plus faible dans B que dans A. De même, la teneur en R-PE est plus importante dans les échantillons issus de B que dans ceux issus de A. Cette différence ne peut être corrélée à la bathymétrie. En effet, le site A est d'une profondeur moyenne plus importante que le site B. Ainsi, la quantité énergétique incidente dans l'eau est moins importante. Or une étude de 1990 a mis en évidence une diminution de la teneur

en phycobiliprotéines et une augmentation de la teneur en chlorophylle *a* en réponse à une augmentation de l'intensité lumineuse chez l'algue rouge *Corallina elongata* (Algarra *et al.* 1990). Cette étude est corrélée avec les observations faites dans de nombreuses études révélant une teneur en R-PE plus importante en hiver qu'en été (Denis *et al.* 2010). Ainsi cette différence constatée au niveau de la teneur en R-PE entre les sites A et B est plutôt due à l'irradiance qui est plus importante dans le site A que dans le site B. Effectivement, au cours de la marée, le site A est exposé plus longtemps à la lumière que le site B qui tarde à être découvert et qui est rapidement recouvert par l'eau lors du flot et du jusant. Il serait intéressant de tester l'effet de différentes intensités lumineuses sur le développement et le contenu biochimique d'algues rouges.

Au niveau de la teneur en sucres hydrosolubles, les échantillons issus de B ( $70,23 \pm 4,39$  mg.g<sup>-1</sup> MS) sont également plus riches que ceux issus de A ( $54,12 \pm 6,99$  mg.g<sup>-1</sup> MS) expliquant pourquoi les thalles du site B sont plus visqueux au touché. La même observation avait été faite en 2010. Cela peut s'expliquer par un hydrodynamisme plus important au niveau du site B, provoquant une sécrétion de polysaccharides plus importante chez ces algues afin de se protéger des embruns.

La durée d'ensoleillement ne semble pas avoir d'impact sur la teneur en lipides, puisque des valeurs similaires ont été obtenues pour les prélèvements de 2010 et de 2013. Ce qui est confirmé par deux études précédentes réalisées sur *Grateloupia turuturu*, qui ont montré qu'il n'y a pas de variations saisonnières au niveau des lipides (Denis *et al.* 2010; Kendel *et al.* 2013). Par contre, elle semble avoir un impact sur la teneur en protéines totales puisqu'elles sont plus importantes en 2013 qu'en 2010. Cependant, des différences significatives sont observées entre les deux sites pour les deux études. Ainsi, ces différences intersites ne peuvent être dues qu'aux caractéristiques de ces deux sites. Les échantillons du site B sont plus riches en protéines totales et en lipides que ceux du site A. Il est difficile d'établir une hypothèse permettant d'expliquer ces observations. Les facteurs se différenciant entre les deux sites, que sont la bathymétrie et l'hydrodynamisme, peuvent être à l'origine de ces différences observées.

#### **4. Conclusion**

L'objectif de cette étude était d'étendre les connaissances sur la composition biochimique de *Grateloupia turuturu* et principalement sur la R-PE. Cette étude démontre qu'il existe un effet intersite au niveau du contenu biochimique en protéines, lipides, sucres hydrosolubles, protéines hydrosolubles, cendres et matière sèche. L'étude de 2013 a permis de confirmer les observations faites en 2010 et surtout de dégager des hypothèses permettant d'expliquer ces différences. Ainsi la durée d'ensoleillement semble avoir un impact au niveau

biochimique et il constitue le facteur majeur responsable des variations saisonnières et annuelles observées dans le modèle d'étude. De plus, la bathymétrie, l'hydrodynamisme et le positionnement le long de l'estran semblent constituer des facteurs importants intervenant dans le développement de *Grateloupia turuturu*. Une étude précédente, a montré l'impact des variations saisonnières sur le contenu biochimique de *G. turuturu* prélevée sur un autre site d'échantillonnage (de la même zone littorale) (Denis *et al.* 2010). Ainsi les résultats de notre étude apportent des informations complémentaires à celles déjà publiées et soulignent l'importance des facteurs environnementaux des sites de prélèvement et des conditions de stockage, sur le plan biologique mais également sur le plan biochimique, et particulièrement sur la R-PE. Le site d'échantillonnage et la méthode de stockage ont également été étudiés afin d'observer leurs effets sur l'extraction de la R-PE de *Grateloupia turuturu*, prélevée sur la façade Atlantique (France). L'originalité de cette étude réside dans le fait qu'elle se focalise sur les étapes situées en amont de l'extraction de la R-PE, c'est-à-dire l'influence du site de prélèvement et la méthode de stockage de l'algue. Le but est de montrer comment ces étapes ont un impact sur l'extraction de la R-PE. En analysant la R-PE, cette étude montre que la congélation constitue les meilleures conditions de stockage de la biomasse. En effet, cette méthode est la plus intéressante au regard de la qualité du pigment. De plus, cette étude a montré que le rendement et la pureté du pigment varient significativement entre les deux sites d'étude. Ces observations sont intéressantes, dans un but de compréhension du mode de développement de l'organisme *Grateloupia turuturu* d'une part et d'autre part dans un but de valorisation de cet organisme notamment au travers de l'utilisation de la R-PE comme colorant alimentaire.

Pour mieux comprendre l'effet des variables environnementales sur la composition biochimique et surtout sur la R-PE, il serait intéressant de procéder à une mise en culture de l'algue. Ainsi cette culture en conditions contrôlées permettrait d'observer l'effet de chaque variable indépendamment l'une de l'autre sur la composition biochimique mais surtout sur la teneur en R-PE et sur sa structure. Des analyses structurales du pigment pourraient ainsi permettre d'expliquer le caractère proliférant de l'algue. La culture de *Grateloupia turuturu* serait également intéressante pour le développement d'une biomasse standardisée pour une utilisation directe en alimentation humaine et indirecte au travers de la R-PE comme colorant alimentaire.

Pour que ce pigment puisse être employé en alimentaire comme colorant, il est indispensable de connaître ses limites de stabilité. C'est ainsi que l'étude du chapitre suivant s'est intéressée à l'effet de la température, du pH, de la lumière et du stockage (4°C et -

20°C) sur la stabilité de la R-PE. Cette étude permet également de définir les conditions expérimentales à mettre en œuvre pour une bonne préservation du pigment.





## **Chapitre IV : Influence des paramètres physicochimiques (température, lumière, pH) sur la stabilité de la R-PE de *Grateloupia turuturu* et de la B-PE de *Porphyridium cruentum***

### **1. Contexte de l'étude**

Les colorants extraits de sources naturelles suscitent de plus en plus d'intérêt notamment du point de vue de la santé humaine mais aussi de l'environnement (Fleurence 2004; Sekar et Chandramohan 2008). Les phycoérythrine ont fait l'objet de nombreuses études depuis plusieurs années pour leurs propriétés spectrales, fluorescentes et colorantes (Fleurence 2003; Tandeau de Marsac 2003) qui leur confèrent alors plusieurs applications industrielles. Ces applications nécessitent que les phycoérythrine soient stables dans les diverses matrices dans lesquelles elles vont être intégrées. Elles sont sensibles à de nombreux paramètres comme la lumière, la température, la force ionique, le pH ou encore la concentration protéique, qui vont induire des modifications irréversibles au niveau des caractéristiques spectroscopiques voir même une dénaturation. La phycocyanine et la phycoérythrine subissent une réaction réversible d'auto association/dissociation en fonction des changements des conditions de solution comme le pH, la force ionique, la température et également la concentration protéique (Ogawa *et al.* 1991). Ainsi il est primordial de connaître les limites de stabilité du pigment afin de pouvoir le valoriser au niveau industriel.

L'étude de l'influence de paramètres physicochimiques sur la stabilité de la R-PE permet également de définir les conditions expérimentales optimales permettant de maintenir au mieux la structure fonctionnelle du pigment.

Ce chapitre présente les résultats obtenus suite à l'étude de la stabilité comparée de deux phycoérythrine en réponse à des paramètres physiques et chimiques que sont la lumière, la température et le pH. Ces pigments d'intérêt sont la R-PE de *Grateloupia turuturu* et la B-PE de *Porphyridium cruentum*.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'un article scientifique soumis pour publication dans le journal *Food Chemistry* (Annexe 2).

### **2. Protocole de l'étude**

Les tests ont été réalisés dans les mêmes conditions pour les deux phycoérythrine. Les extraits bruts lyophilisés sont solubilisés dans du tampon phosphate (pH 7,1 ; 20 mM) de manière à obtenir une concentration en phycoérythrine à 0,01 mg/mL. Pour chaque

condition, les changements de couleur sont observés, les spectres de fluorescence et d'absorbance sont effectués et les concentrations en phycoérythrine sont déterminées.

### **2.1. Stabilité à la lumière**

Les extraits bruts de pH 7,1 sont exposés à la lumière d'une intensité de  $33,57 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (L11-1000 Data Logger) à 4°C pendant différentes durées : de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 14 et 48 heures.

### **2.2. Stabilité au pH**

Les extraits bruts sont solubilisés dans différents tampons phosphates de pH allant de 2 à 12. Ces expérimentations sont réalisées à 4°C et à l'obscurité.

### **2.3. Stabilité à la température**

Les extraits bruts de pH 7,1 sont chauffés au bain-marie pendant une heure et à l'obscurité à différentes températures : 20, 40, 60 et 100°C. Les échantillons à 4°C servent de témoins.

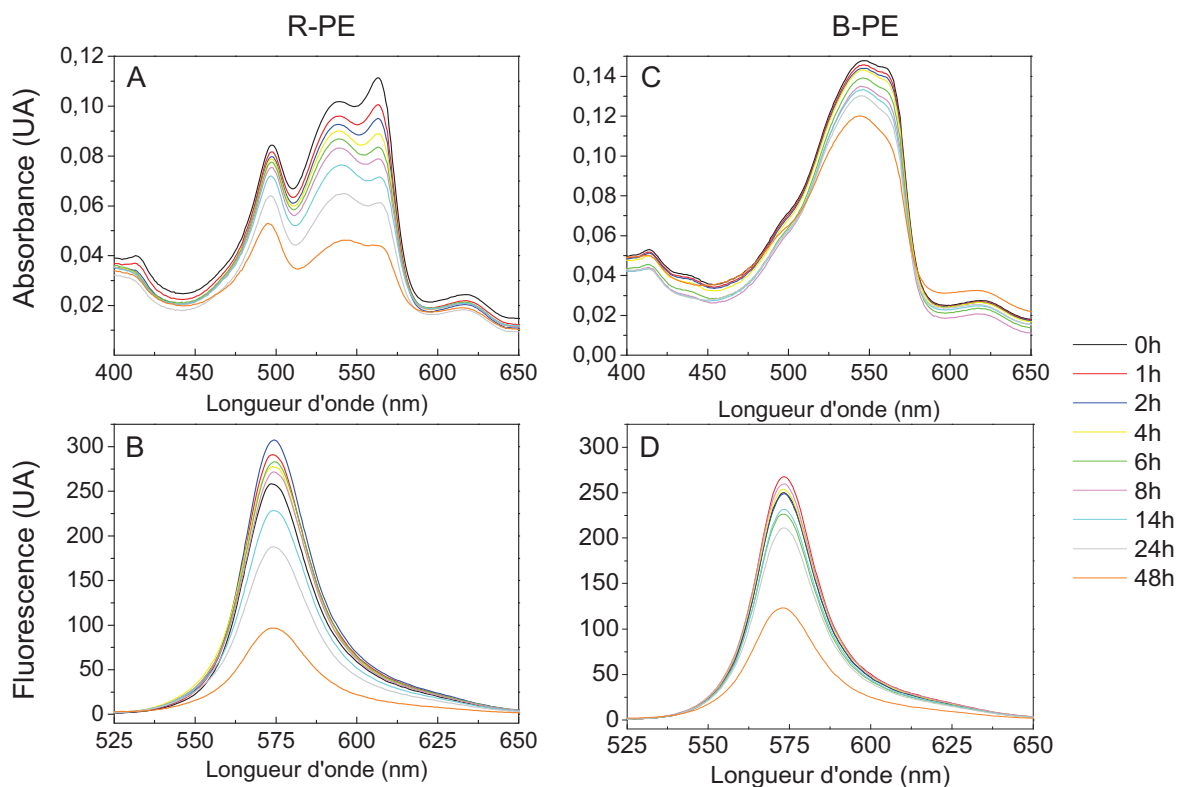
### **2.4. Stabilité en fonction de la température et de la durée de stockage**

Parallèlement, afin de voir l'effet de la durée de stockage à 4°C et -20°C, les extraits bruts de pH 7,1 sont stockés à 4°C et -20°C à l'obscurité pendant 0, 6, 24, 48 heures, 1 et 2 semaines.

### 3. Résultats et discussion de l'étude

#### 3.1. Stabilité à la lumière

La Figure 58 présente les spectres d'absorbance et de fluorescence de la R-PE (A et B) et de la B-PE (C et D).



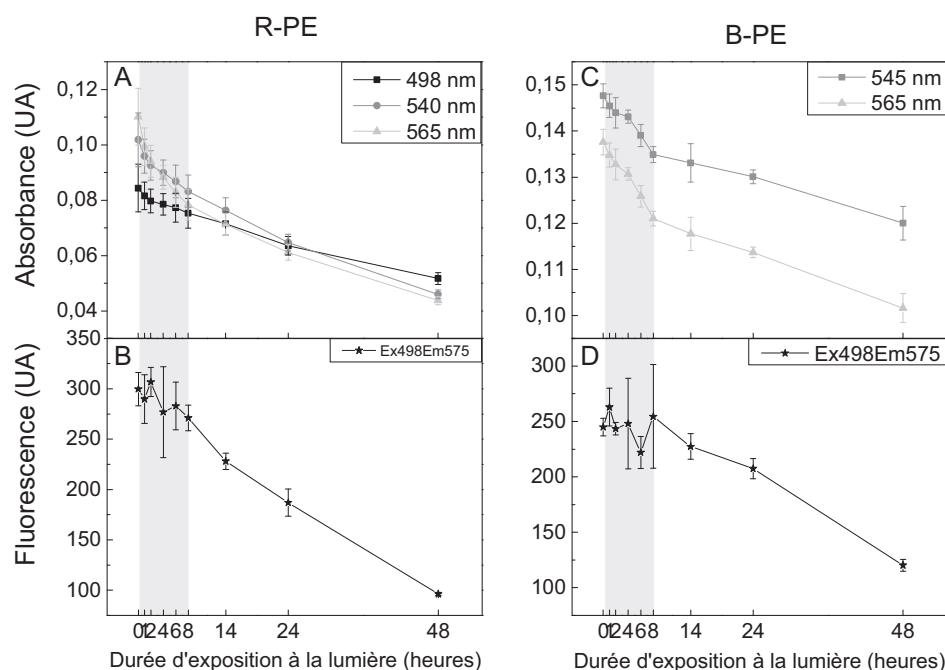
**Figure 58 : effet de la durée d'exposition à la lumière (0 à 48 heures) sur les spectres d'absorbance et de fluorescence de la R-PE et de la B-PE**

Le spectre d'absorbance de la R-PE de *Grateloupia turuturu* à pH 7,1 et 4°C est caractéristique des phycoérythrine qui contiennent les chromophores PUB et PEB (Figure 58 A). Il présente les trois pics caractéristiques à 498 nm correspondant au chromophore PUB et à 540 et 565 nm qui sont dus à la PEB. Le spectre de fluorescence (Figure 58 B) permet d'identifier le maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 575 nm ce qui est classiquement observé pour la R-PE.

En ce qui concerne la B-PE, elle présente de légères différences spectrales par rapport à la R-PE. En effet à pH 7,1 et à 4°C, la B-PE absorbe fortement à 545 nm, et possède un seul épaulement à 495 nm (Figure 58 C). Ceci est dû à la différence de positionnement des chromophores sur les sous-unités mais également à un ratio PEB/PUB différent. Au niveau de la fluorescence, la B-PE émet également à 575 nm, comme la R-PE (Figure 58 D).

D'après les spectres d'absorbance, les IP ont été déterminés à 0,41 pour la R-PE et 0,30 pour la B-PE.

En comparaison avec le spectre de référence (0 h), des diminutions de plus en plus importantes de l'intensité d'absorption et de fluorescence sont observées lorsque la durée d'exposition à la lumière augmente. Pour la R-PE, les pics à 565 et 540 nm diminuent de manière plus importante que le pic à 498 nm, mais ils diminuent tous lorsque la durée d'exposition à la lumière augmente (Figure 58 A). Après 48 heures, les absorbances à 540 et 565 nm ont diminué de 55% et 60% respectivement et celle à 498 nm de seulement 39% ( $p < 5\%$ ). La stabilité plus importante du PUB est due à la double liaison entre les cycles C et D des résidus Cys  $\beta 50$  et  $\beta 61$ , respectivement alors que le PEB est lié à la protéine par un seul résidu Cys (Liu *et al.* 2009). On observe la même évolution pour le pic de fluorescence dont l'intensité décroît de 68% après 48 heures (Figure 58 B). Pour la B-PE, les spectres d'absorbance et de fluorescence (Figure 58 C et D) présentent de plus faibles réductions d'intensité. Après 48 heures, une diminution de l'absorbance de 19% et 26% à 545 et 565 nm et de 51% pour la fluorescence est observable. De plus, après 48 heures, les solutions de R-PE et de B-PE sont décolorées et les concentrations en R-PE et B-PE ont été réduites de  $70 \pm 1 \%$  et  $30 \pm 2 \%$  respectivement.



**Figure 59 : valeurs d'absorbance et de fluorescence maximales de la R-PE et de la B-PE en fonction de la durée d'exposition à la lumière ; la zone de stabilité est identifiée par la zone grisée**

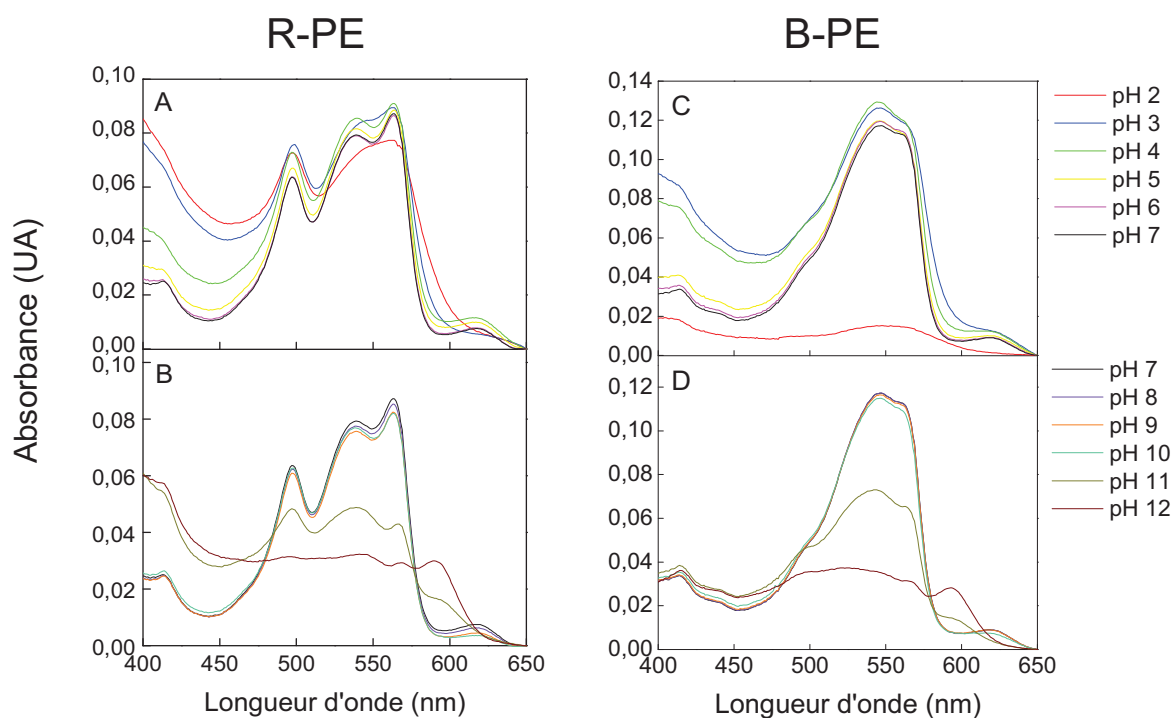
Sur la Figure 59, les absorbances à 498, 540 et 565 nm pour la R-PE (Figure 59 A), les absorbances à 545 et 565 nm pour la B-PE (Figure 59 C), l'émission de fluorescence à 575 nm pour la R-PE (Figure 59 B) et pour la B-PE (Figure 59 D) sont toutes représentées en fonction de la durée d'exposition à la lumière. La zone grisée représente la zone de stabilité, zone dans laquelle les valeurs ne sont pas statistiquement différentes ( $p < 5\%$ ). Les résultats montrent que la R-PE et la B-PE sont stables pour une même durée d'exposition à la lumière, à savoir jusqu'à 8 heures.

Des résultats similaires ont été obtenus pour la R-PE de *Palmaria palmata* (Galland-Irmouli 1999). Cette étude a montré une réduction de l'intensité d'absorbance de moitié après 6 heures d'exposition à la lumière. Après 24 heures, les résultats indiquent une perte de coloration de la solution et un spectre d'absorbance fortement modifié. De plus, cette étude a mis en évidence une relation entre la concentration du pigment et la sensibilité à la lumière, avec une sensibilité plus importante pour de faibles concentrations. Une autre étude a révélé que la R-PE de *Corallina elongata* présente une plus grande tendance à perdre ses chromophores lorsqu'elle est exposée à la lumière et l'effet de celle-ci est encore plus élevé après 15 jours d'exposition (Rossano *et al.* 2003).

### 3.2. Stabilité au pH

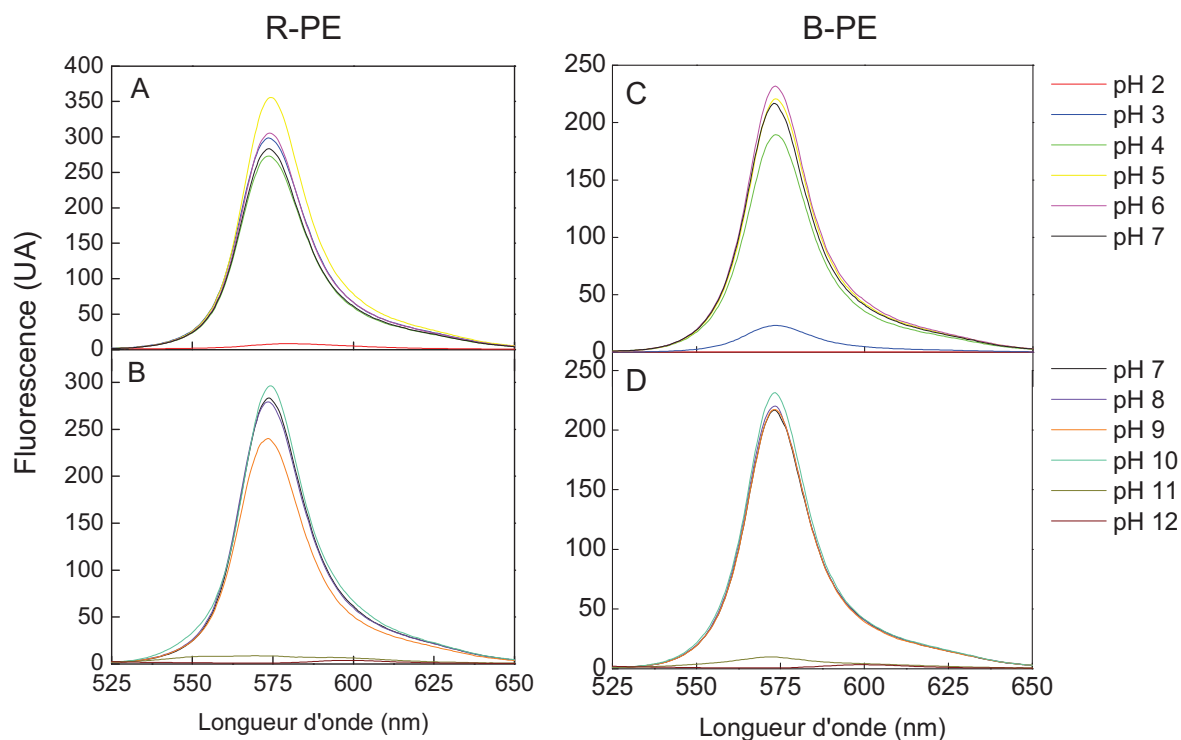
Aucune variation de coloration n'est observée pour la R-PE comme pour la B-PE pour des pH compris entre 4 et 10. À pH 2 et 3, les solutions de R-PE sont violacées et des précipités sont observés dans les échantillons de B-PE. À pH 11 et 12, l'intensité de coloration diminue jusqu'à ce que les solutions deviennent incolores.

La Figure 60 présente les spectres d'absorption des phycoérythrines en fonction du pH : pH 2 à 7 pour la R-PE (Figure 60 A) et pour la B-PE (Figure 60 C) et pH 7 à 12 pour la R-PE (Figure 60 B) et pour la B-PE (Figure 60 D).



Pour les pH acides compris entre 4 et 7, aucune différence significative n'est observée en ce qui concerne les spectres d'absorbance et la concentration en PE. Par contre pour des pH fortement acides (pH 2 et 3), les spectres d'absorbance de la R-PE (Figure 60 A) et de la B-PE (Figure 60 C) sont fortement affectés. À pH 2, les pics disparaissent à 545 et 565 nm pour la R-PE et à 495 nm pour la B-PE. À pH 3, le spectre de la R-PE est déformé. Pour les pH alcalins, les concentrations en PE sont stables pour des pH compris entre 7 et 10. À pH 11, une forte diminution de l'intensité d'absorbance est observée, tandis qu'à pH 12 les spectres des deux PE sont déformés dus à la précipitation et à la dénaturation des protéines.

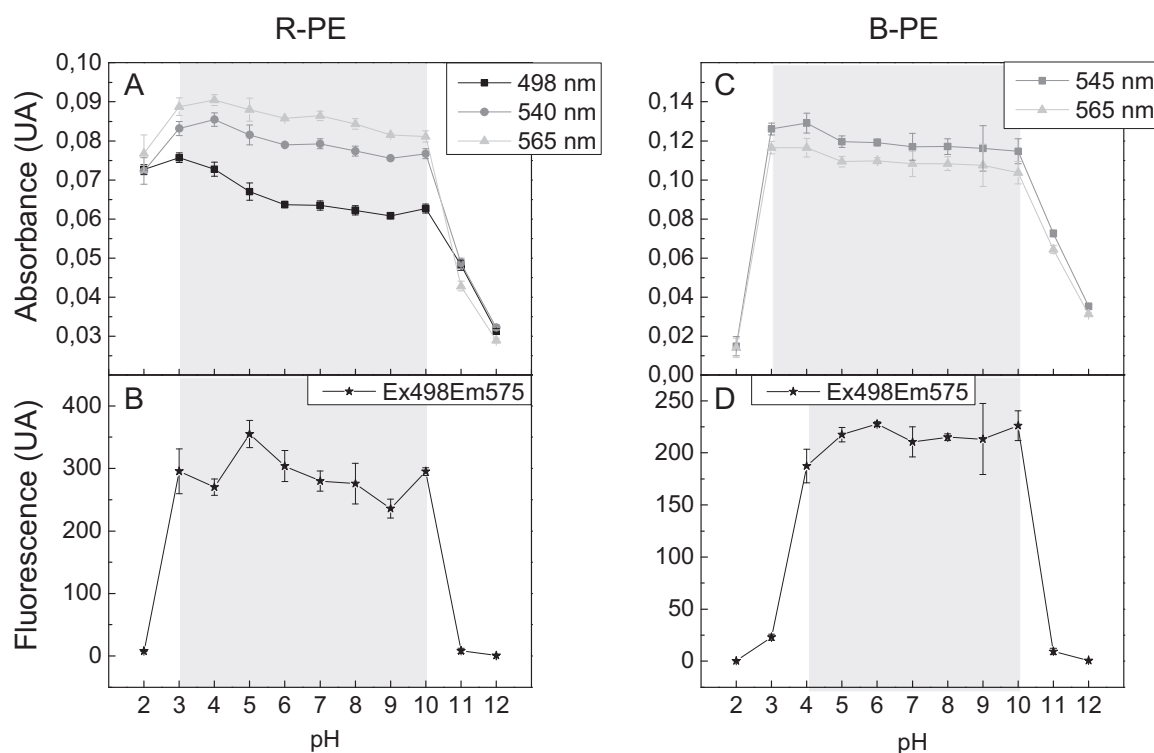
Des modifications au niveau du spectre de fluorescence sont aussi observées et sont présentées Figure 61. Les résultats confirment la zone de stabilité allant de pH 4 à 10 puisque l'émission de fluorescence à 575 nm décroît en-dessous du pH 4 et au-dessus du pH 10. Pour les deux PE, à pH 2 et 11, la fluorescence diminue de 97% et à pH 12 il n'y a plus de fluorescence.



**Figure 61 : effets du pH sur les spectres d'émission de fluorescence de la R-PE et de la B-PE excitées à 498 nm. Le maximum d'émission de fluorescence est de 575 nm**

Sur la Figure 62, les absorbances à 498, 540 et 565 nm pour la R-PE (Figure 62 A), les absorbances à 545 et 565 nm pour la B-PE (Figure 62 C), l'émission de fluorescence à 575 nm pour la R-PE (Figure 62 B) et pour la B-PE (Figure 62 D) sont représentées en fonction du pH. Les PEs présentent une large zone de stabilité de pH 3 à 10 pour la R-PE et pour les valeurs d'absorbance de la B-PE et de 4 à 10 pour la B-PE au niveau des valeurs de fluorescence (la zone grisée représente la zone de stabilité dans laquelle les valeurs n'ont pas de différences statistiques significatives). Par contre à des pH extrêmes (2, 11 et 12), l'absorbance et la fluorescence sont fortement modifiées. Ceci suggère que la protéine a des propriétés de transfert d'énergie stables à des pH de 3 à 10. Des résultats similaires de stabilité au pH ont été rapportés pour d'autres PEs. La R-PE de *Palmaria palmata* (Galland-Irmouli 1999; Galland-Irmouli *et al.* 2000) et la R-PE de *Polysiphonia urceolata* (Liu *et al.* 2009) possèdent une bonne stabilité dans la gamme de pH 3,5 - 9,5. La C-PE de *Nostoc muscorum* (Ranjitha et Kaushik 2005), la R-PE de *Porphyra yezoensis* (Orta-Ramirez *et al.* 2000) et la R-PE du Nori *Porphyra sp.* (Ogawa *et al.* 1991) sont stables à des pH compris entre 5 et 9. La R-PE de *Corallina elongata* est très stable aux pH situés entre 6 et 8,5 (Rossano *et al.* 2003).



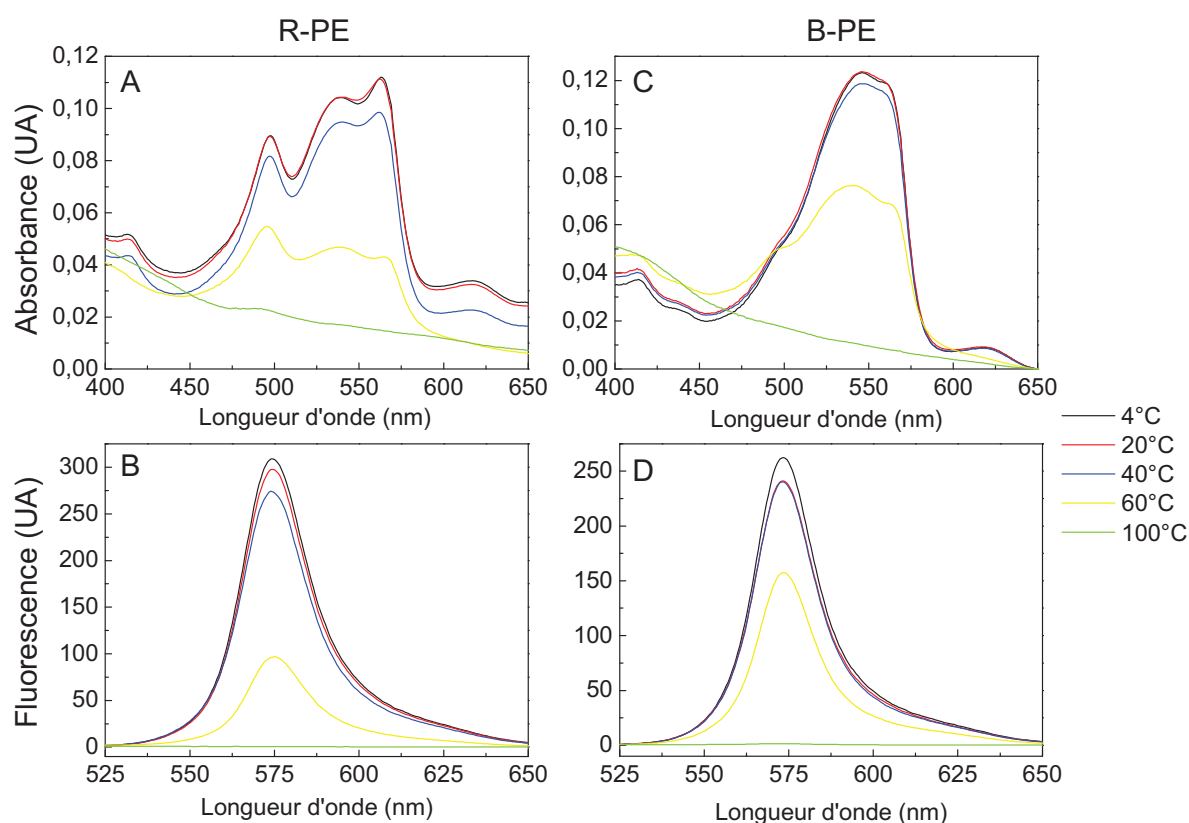


**Figure 62 : valeurs d'absorbance et de fluorescence maximales de la R-PE et de la B-PE en fonction du pH ; la zone de stabilité est identifiée par la zone grisée**

Les propriétés spectrales des PBP sont très pH-dépendantes (Bogorad 1975; Ohad *et al.* 1980). Des modifications de pH peuvent induire des perturbations des propriétés électrostatiques et des liaisons hydrogènes impliquées dans la structure de la protéine qui peuvent provoquer des modifications de la structure des chromophores (Claire 1992; Liu *et al.* 2009). En 1991, une équipe a mis en évidence que le pH provoque des modifications de la conformation de la protéine. Ainsi, dans des solutions acides d'un pH proche du pI, ils ont montré que la R-PE de *Porphyra sp* est dans une forme agrégée alors que dans des conditions neutres la R-PE est globulaire ou compactée et est partiellement dépliée à un pH supérieur à 9 (Ogawa *et al.* 1991).

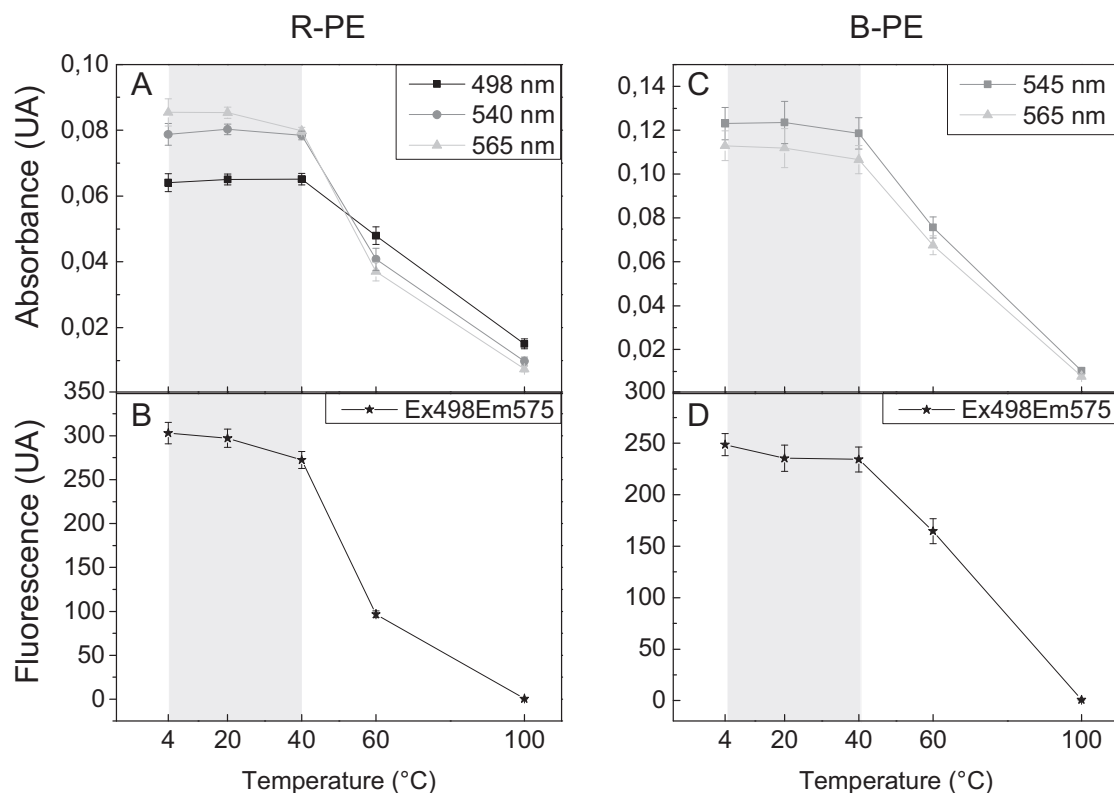
### 3.3. Stabilité à la température

Les spectres d'absorbance de la R-PE (Figure 63 A) et de la B-PE (Figure 63 C) et les spectres de fluorescence de la R-PE (Figure 63 B) et de la B-PE (Figure 63 D) montrent que les deux PEs ont une bonne stabilité à la température jusqu'à 40°C. Les mêmes observations entre les spectres d'absorbance et de fluorescence peuvent être faites : une diminution de l'intensité du maximum (d'absorption et de fluorescence) à 60°C et aucune absorption ni fluorescence n'est observée à 100°C. Ainsi à 60°C, la R-PE présente une diminution de concentration de  $70 \pm 0 \%$  et de  $50 \pm 3 \%$  pour la B-PE.



**Figure 63 : effets de la température (4, 20, 40, 60 et 100°C) sur les spectres d'absorption et de fluorescence de la R-PE et de la B-PE**

La Figure 64 résume les observations précédentes en représentant uniquement les valeurs d'absorbance à 498, 540 et 565 nm pour la R-PE (Figure 64 A), les valeurs d'absorbance à 545 et 565 nm pour la B-PE (Figure 64 C) et les valeurs d'émission de fluorescence à 575 nm pour la R-PE (Figure 64 B) et pour la B-PE (Figure 64 D) en fonction de la température. Ainsi ces graphiques confirment que les deux PEs sont stables jusqu'à 40°C (la zone grisée représente la zone de stabilité dans laquelle les valeurs n'ont pas de différences statistiques significatives).



**Figure 64 : valeurs d'absorbance et de fluorescence maximales de la R-PE et de la B-PE en fonction de la température ; la zone de stabilité est identifiée par la zone grisée**

Ces résultats sont en concordance avec des résultats d'études précédentes. D'Agnolo *et al.*, en 1993, ont montré que les spectres d'absorbance de la R-PE de *Gracilaria longa* sont fortement modifiés par la température lorsque celle-ci atteint 45-50°C. Ils spécifient que seul le pic à 495 nm montre une bonne stabilité à la température. Ils concluent qu'une augmentation de température induit une diminution de la teneur en hélice alpha causant ainsi une perte de stabilité du pigment. La R-PE de *Dilsea cernosa* (Claire 1992) et de *Palmaria palmata* (Galland-Irmouli 1999; Galland-Irmouli *et al.* 2000) présentent également une bonne stabilité jusqu'à 60°C.

### 3.4. Stabilité en fonction de la température et de la durée de stockage

L'étude de la stabilité des PEs au cours du stockage a été réalisée à -20°C et à 4°C à l'obscurité et les résultats obtenus sont présentés Figure 65. Le spectre d'absorbance de la R-PE (Figure 65 A) après deux semaines (soit 336 heures) de stockage à -20°C est légèrement modifié par rapport à celui au temps 0 (0 heure) alors que celui correspondant à un stockage à 4°C (Figure 65 B) est complètement déformé. Le même phénomène est observé pour la B-PE (Figure 65 C et D) qui présente même une plus grande stabilité à -20°C que la R-PE.

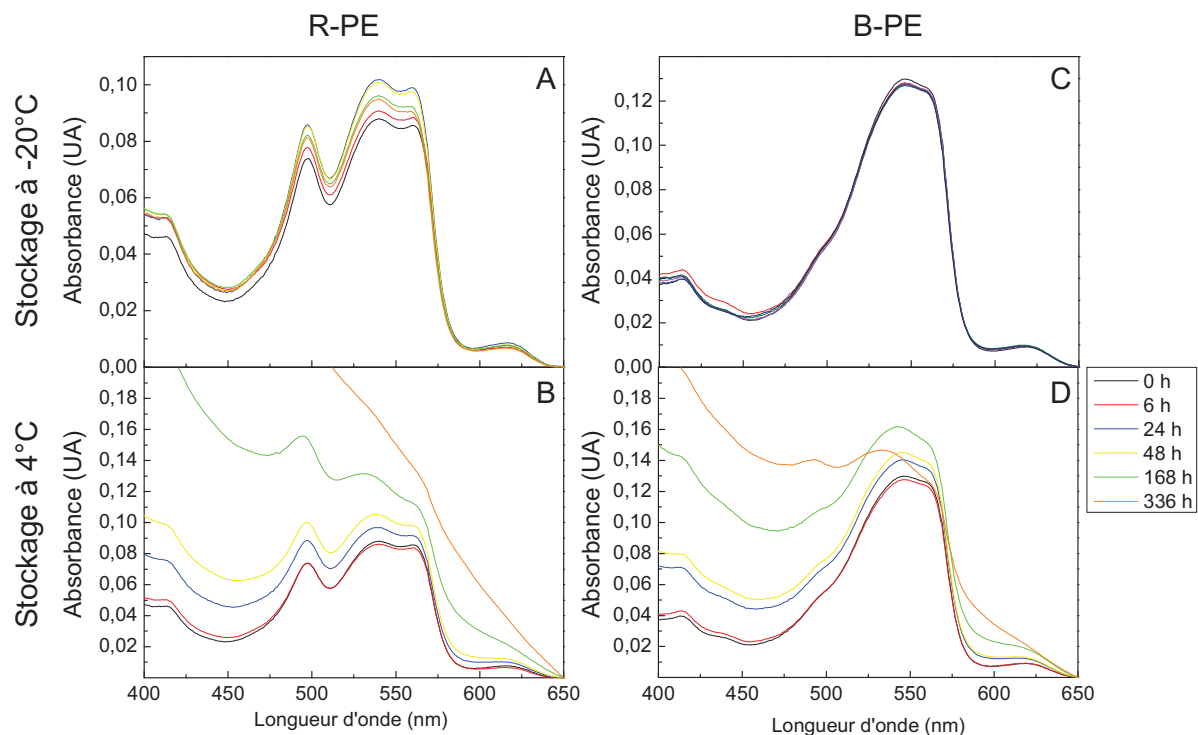


Figure 65 : effets de la durée de stockage (0h, 6h, 24h, 48h, 1 semaine et 2 semaines) à 4°C et -20°C sur les spectres d'absorption et de fluorescence de la R-PE et de la B-PE

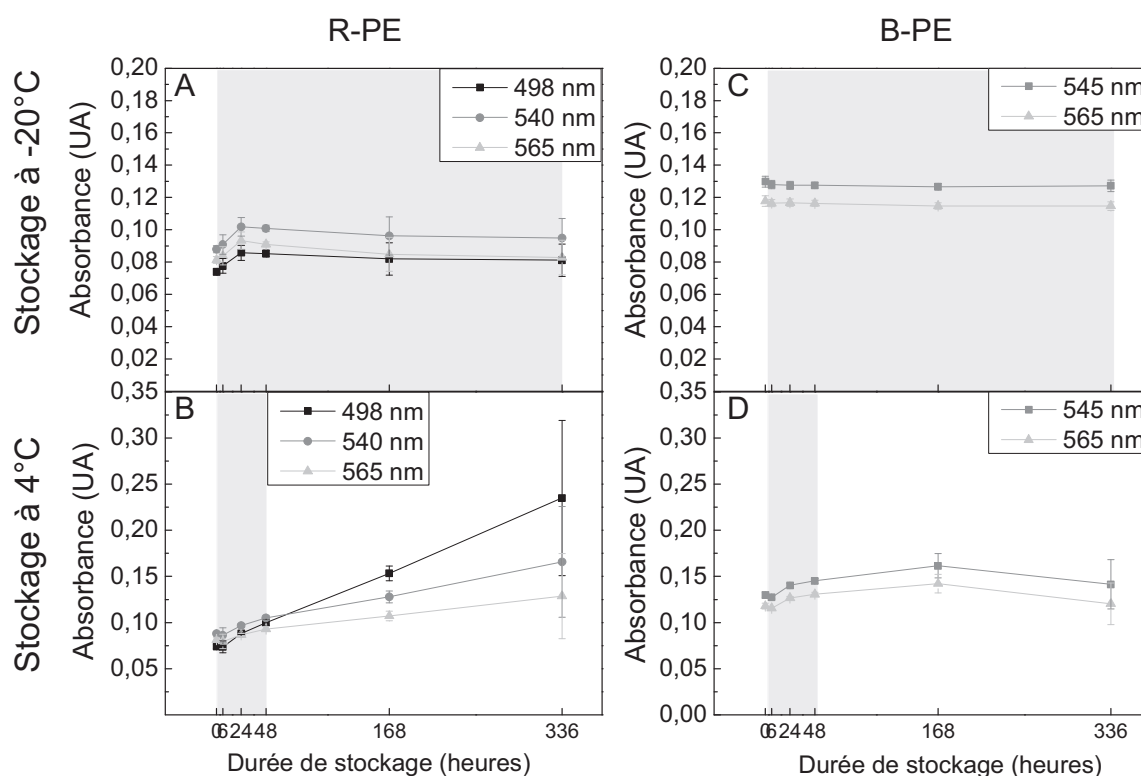


Figure 66 : valeurs d'absorbance et de fluorescence maximales de la R-PE et de la B-PE en fonction de la durée du stockage à -20°C et à 4°C

Ceci est confirmé par des modifications d'absorbance à 498, 540 et 565 nm pour la R-PE et à 545 et 565 nm pour la B-PE (Figure 66). Ainsi pour les deux PEs, à 4°C, celles-ci sont stables jusqu'à 48 heures alors qu'à -20°C les propriétés d'absorbance sont maintenues après 2 semaines (336 heures) de stockage. Les mêmes observations ont été obtenues en fluorescence.

Ces résultats diffèrent de ceux de Rossano *et al.* (2003) sur la R-PE de *Corallina elongata*, lesquels ont mis en évidence que les échantillons conservés à 4°C à l'obscurité présentent une meilleure stabilité après 35 jours que ceux conservés à -20°C. Cependant, les échantillons ont été congelés et décongelés successivement au cours des 35 jours afin de réaliser les mesures. De plus, dans de nombreuses études, les PEs sont très souvent extraites d'algues congelées ou décongelées.

#### 4. Conclusion

La lumière joue un rôle au niveau de la PE et plus largement au niveau du contenu biochimique. Le type de lumière, c'est-à-dire les longueurs d'ondes, ainsi que la quantité de lumière parvenant à l'algue, ont un impact sur le contenu biochimique mais également sur la stabilité du pigment. Il en est de même pour le pH et la température. Dans un but de valorisation de la R-PE dans une application industrielle (colorant alimentaire, ou cosmétique) il est donc nécessaire de connaître la zone de stabilité du pigment à la lumière afin de permettre une formulation efficace. Les résultats de cette étude suggèrent également que le mode de stockage du pigment en solution a un impact au niveau de sa préservation et donc de sa structure fonctionnelle ; il en est de même pour les conditions d'extraction et de purification. Ainsi après extraction, les expérimentations peuvent être conduites à l'abri de la lumière, dans une gamme de pH compris entre 4 et 10 et à des températures inférieures à 40°C. Des résultats similaires ont été obtenus avec la B-PE de *Porphyridium cruentum* constituant également une source de colorant alimentaire.

Ces conditions sont établies pour les extraits bruts et non pour les conditions d'extraction. En effet, d'autres études menées au laboratoire (résultats non publiés à ce jour) ont montré qu'il n'est pas possible d'extraire la R-PE avec un tampon de pH 4.

Cette étude soulève un point important : la stabilité facteur-dépendante. Il serait intéressant de tester les effets quadratiques des différents facteurs par la méthode des plans d'expérience.

Cette présente étude a également permis de définir les conditions expérimentales optimales qu'il faut employer afin de préserver au mieux les propriétés du pigment. Ces résultats

Chapitre IV : Influence des paramètres physicochimiques (température, lumière, pH) sur la stabilité de la R-PE de *Grateloupia turuturu* et de la B-PE de *Porphyridium cruentum*

---

permettent de connaître les limites de stabilité du pigment. Ils ont contribué à l'élaboration d'un protocole de purification de la R-PE de *Grateloupia turuturu* ayant pour objectif la caractérisation de ce pigment. Ce travail est présenté dans le chapitre suivant.





## **Chapitre V : Mise au point d'un protocole de purification de la R-PE de *Grateloupia turuturu*. Étude physicochimique des différentes fractions.**

### **1. Contexte de l'étude**

Différentes méthodes ont été mises en œuvre pour la purification de phycoérythrine. La précipitation au sulfate d'ammonium est généralement employée comme étape préliminaire de purification avec différents pourcentages de saturation (de 25% à 85%). La chromatographie échangeuse d'ions a permis la purification de la R-PE de *Polysiphonia urceolata* (Liu *et al.* 2005) et de *Ceramium isogonum* (Kaixian *et al.* 1993). Un protocole de purification de la R-PE par chromatographie de gel filtration a été mis au point pour *Gastroclonium coulteri* et *Porphyra tenera* (MacColl et Eisele 1996). L'association de ces deux techniques chromatographiques a beaucoup été employée : pour *Palmaria palmata* (Wang *et al.* 2002), *Heterosiphonia japonica* (Sun *et al.* 2009) et *Corallina officinalis* (Hilditch *et al.* 1991). La chromatographie de gel d'hydroxyapatite a aussi été utilisée en association avec la chromatographie de gel filtration pour *Corallina elongata* (Rossano *et al.* 2003), *Phyllophora antarctica* et *Iridaea cordata* (MacColl *et al.* 1996) et avec la chromatographie d'échange d'ions pour *Polysiphonia urceolata* Grev (Niu *et al.* 2006).

Sur un plan fondamental il est nécessaire d'obtenir de la R-PE purifiée afin de pouvoir la caractériser ; l'idéal étant de développer un protocole qui soit rapide et le moins coûteux possible. Les protocoles de purification classiques consistent en de longues et complexes procédures nécessitant plusieurs étapes.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont permis le développement d'un protocole de purification de la R-PE de *Grateloupia turuturu* en une seule étape de chromatographie (échange d'anions). Un article sur ce protocole de purification est en cours de rédaction et sera prochainement soumis dans une revue internationale.

### **2. Protocole de purification**

#### **2.1. Optimisation des conditions d'extraction**

L'étude de Denis *et al.* (2009a) montre que l'extraction à partir d'algues lyophilisées cryobroyées fournit de meilleurs rendements en R-PE et un meilleur IP qu'une biomasse fraîche. Elle a également montré que l'extraction à l'eau et au tampon phosphate aboutissent à des résultats similaires. Pour optimiser les conditions d'extraction, en particulier maîtriser le pH, le tampon phosphate a été retenu comme solvant d'extraction.

Les résultats du Chapitre IV, ont permis de déterminer les conditions optimales de stabilité d'un extrait de R-PE vis-à-vis du pH, de la lumière et de la température. Il faut travailler à l'abri de la lumière, à 4°C et à pH 7.

Afin d'optimiser les conditions d'extraction, le ratio optimal masse de poudre algale/volume de tampon phosphate a été testé. Parallèlement, des extractions en cascade ont été réalisées et comparées à une extraction simple.

### 2.1.1. Quel ratio masse de poudre algale/volume de tampon d'extraction est le plus pertinent ?

Différents rapports masse de poudre algale/volume de tampon d'extraction ont été testés dans le but d'optimiser le rendement d'extraction en R-PE. Les résultats de cette étude sont présentés dans le Tableau XV.

**Tableau XV : rendement d'extraction en R-PE et IP moyens obtenus selon différents rapports masse de poudre algale/volume de tampon (nd : non déterminé)**

Rapport m/V	Rendement (mg R-PE.g <sup>-1</sup> MS)	IP
1/5	nd	nd
1/10	1,78	0,22
1/20	2,30 ± 0,24*	0,20 ± 0,01
1/40	2,61 ± 0,14	0,21 ± 0,00
1/80	2,92 ± 0,40	0,23 ± 0,03

NB : \* résultats significativement différents avec  $p < 5\%$ .

Les résultats obtenus avec les rapports 1/20, 1/40 et 1/80, présentent des IP du même ordre de grandeur et ne sont pas significativement différents. Aucun surnageant n'a pu être obtenu avec le rapport 1/5 car le volume de tampon phosphate ajouté est trop faible pour permettre l'obtention d'un surnageant et réaliser une mesure spectrale. Avec le rapport 1/10, seul un faible volume de surnageant a pu être obtenu et une seule mesure a pu être effectuée. Ce rapport n'a donc pas été pris en compte pour la suite des expérimentations.

Le rendement est proportionnel au volume de tampon ajouté mais ce gain de rendement reste faible par rapport au surcoût engendré par une augmentation de la consommation de réactifs. De plus, cela entraîne une dilution importante de l'extrait. Le rapport 1/20 a donc été retenu pour la suite des expérimentations car il permet d'obtenir un volume de surnageant relativement conséquent, tout en présentant des intérêts économiques.

### 2.1.2. Le nombre d'extraction a-t-il un impact sur les rendements d'extraction en R-PE et sur l'IP?

L'extraction multiple consiste à renouveler l'étape d'extraction en cascade ( $n = 10$ ). Le culot obtenu à l'issue de la première extraction est remis en suspension dans le même volume de tampon et est réextrait selon le même protocole.

Le spectre obtenu au cours de la première étape ( $n = 1$ ) est caractéristique de la R-PE puisqu'il présente les pics à 498, 540 et 565 nm (Figure 67). Par contre dès la quatrième étape ( $n = 4$ ) le spectre de la R-PE n'est plus aussi intense que celui de la première étape ; de même pour le spectre de la sixième étape ( $n = 6$ ). Cela est vraisemblablement dû à la diminution de la concentration de la R-PE dans la matrice algale.

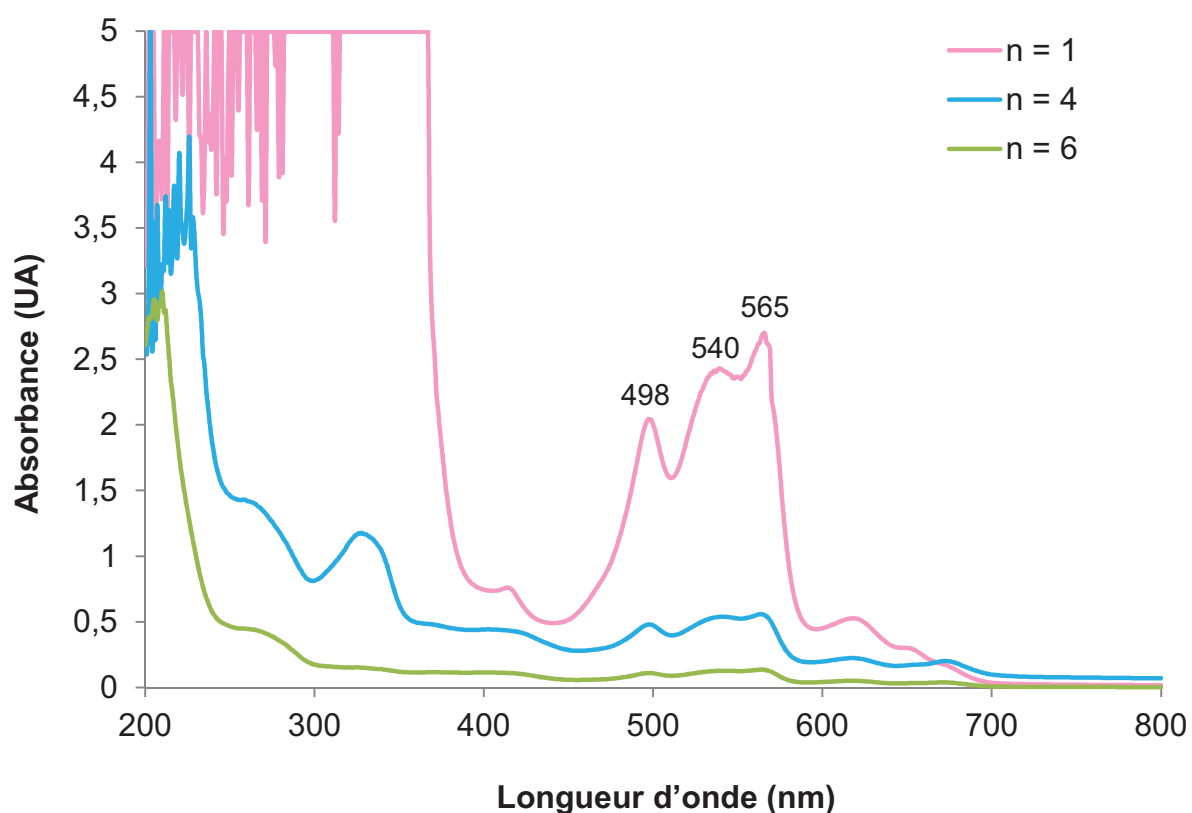


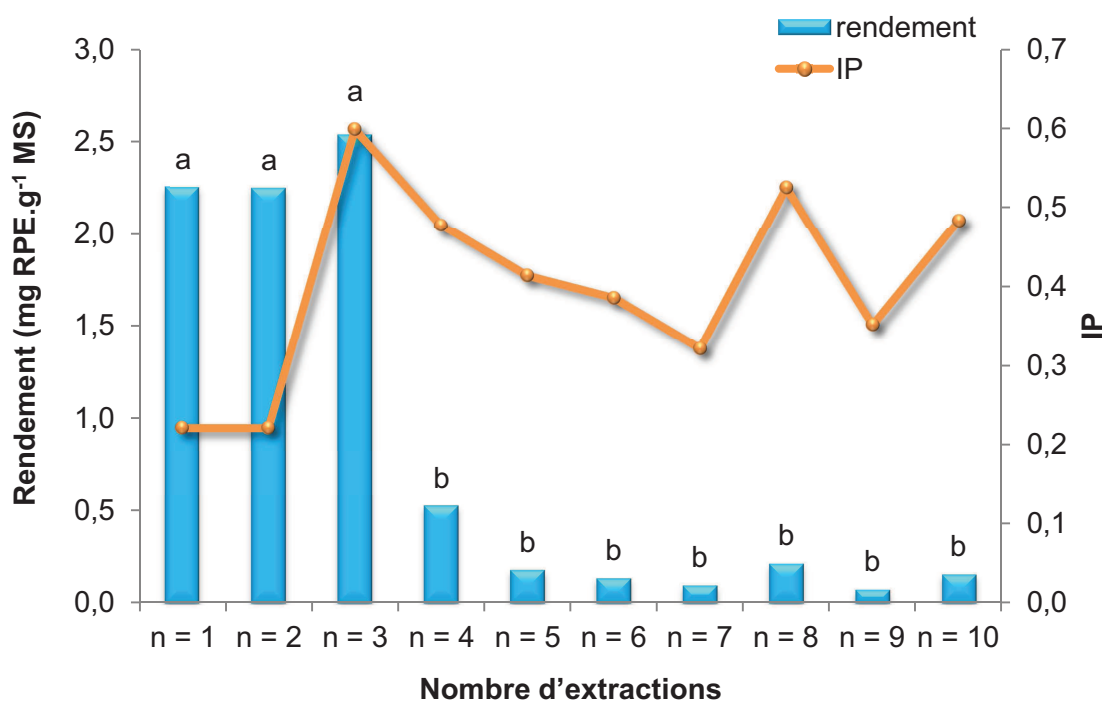
Figure 67 : spectres des surnageants de la 1<sup>ère</sup> étape ( $n = 1$  en rose), de la 4<sup>ème</sup> étape ( $n = 4$  en turquoise) et de la 6<sup>ème</sup> étape ( $n = 6$  en vert)

L'extraction multiple permet l'obtention d'un rendement élevé, près de 5 fois supérieur, par rapport à l'extraction simple (Tableau XVI).

**Tableau XVI : rendements des extractions simple et multiple**

	Rendement (mg R-PE.g <sup>-1</sup> MS)
Extraction simple	2,25
Extraction multiple (n = 3)	7,04
Extraction multiple (n = 10)	11,20

Cependant, la Figure 68 montre que lors d'une extraction multiple, il existe une différence significative entre les rendements des trois premières étapes (groupe a) et le rendement des étapes 4 à 10 (groupe b) ( $P < 5\%$ ). Il est donc inutile de procéder à l'extraction multiple au-delà des trois premières étapes, car les rendements d'extraction de la R-PE des étapes suivantes sont trop faibles. De même, lors de l'extraction, il a été observé que le surnageant de la deuxième étape (n = 2) présente une forte viscosité, gênante pour la suite des expérimentations, et une couleur marron-orangée et non rose.



**Figure 68: rendement en R-PE et IP moyens des différents surnageants obtenus par extraction multiple**

Ainsi, un choix a été fait en faveur de l'extraction simple. Bien que le rendement d'extraction soit meilleur après n = 3 extractions, la deuxième extraction induit une extraction importante de polysaccharides qui s'avèrent très gênants pour la suite des expérimentations. De plus, l'extraction simple présente un gain de temps et minimise les coûts engendrés par cette

étape d'extraction, constituant un avantage majeur lors d'une éventuelle application industrielle.

## **2.2. Purification de la R-PE de *Grateloupia turuturu***

Différentes techniques de purification ont été testées afin de séparer la R-PE de *Grateloupia turuturu* d'une partie des autres composants hydrosolubles.

### **2.2.1. Purification partielle par précipitation au sulfate d'ammonium**

La précipitation au sulfate d'ammonium est classiquement utilisée dans les procédures de purification de la phycoérythrine. La précipitation des protéines par adjonction de sel (ici le sulfate d'ammonium) ou précipitation par *salting-out* joue sur le degré de solubilité des protéines. Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition, il est possible d'en séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins rapidement quand la force ionique de la solution qui les contient est modifiée. Le précipité protéique obtenu résulte de la formation d'un «agrégat» entre les différentes protéines dont les propriétés de solubilité ont été modifiées.

Afin de voir l'impact de la précipitation sur l'IP et sur le rendement en RPE, différents pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium ont été testés à savoir : 80, 85, 90, 95 et 100%. Du sulfate d'ammonium est additionné à l'extrait brut riche en R-PE, obtenu après extraction de la poudre algale, selon le pourcentage de saturation désiré. La solution est placée à 4°C pendant 2h sous agitation puis celle-ci est centrifugée (4°C, 20 min, 25000 x g). Ce protocole a été mis au point par Claire Denis (2009).

Les culots et surnageants obtenus après centrifugation des solutions d'extrait brut aux différents pourcentages de saturation sont présentés Figure 69.

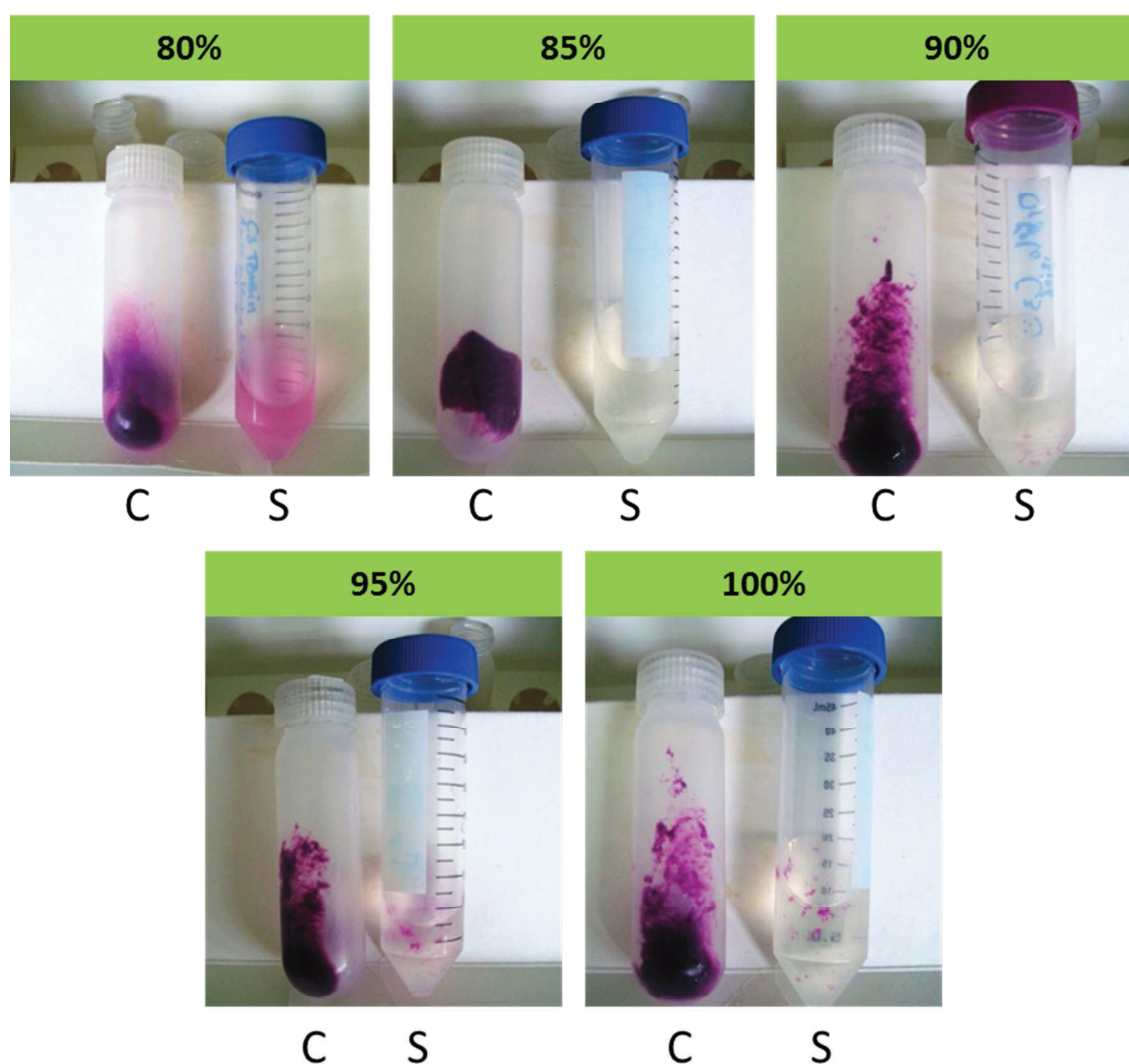


Figure 69 : culots (tubes de gauche) (C) et surnageants (tubes de droite) (S) obtenus après précipitation au sulfate d'ammonium à différents pourcentages de saturation

À une saturation en sulfate d'ammonium de 80%, le surnageant reste rosâtre (tube de droite) tandis qu'à des pourcentages supérieurs, ils sont translucides. Afin de précipiter l'ensemble de la R-PE de *Grateloupia turuturu*, une saturation à 85% en sulfate d'ammonium permet la précipitation de toute la fraction contenant la R-PE.

Les résultats d'IP obtenus par les différentes précipitations au sulfate d'ammonium sont présentés dans le Tableau XVII.

**Tableau XVII : IP moyens du surnageant (EB) avant précipitation et des culots (EP : extrait protéique) obtenus par précipitation au sulfate d'ammonium à différents pourcentages**

	Fractions					
	EB	EP à 80%	EP à 85%	EP à 90%	EP à 95%	EP à 100%
IP	0,49*	0,57	0,60	0,59	0,61	0,53

NB : \* résultats significativement différents avec  $p < 5\%$ .

La précipitation au sulfate d'ammonium à 85% permet d'augmenter l'IP de 22% par rapport à l'EB. En effet, l'IP de l'EB est de 0,49 et après précipitation et remise en suspension du culot l'IP atteint une valeur de 0,60. Ces valeurs sont significativement différentes ( $p < 5\%$ ).

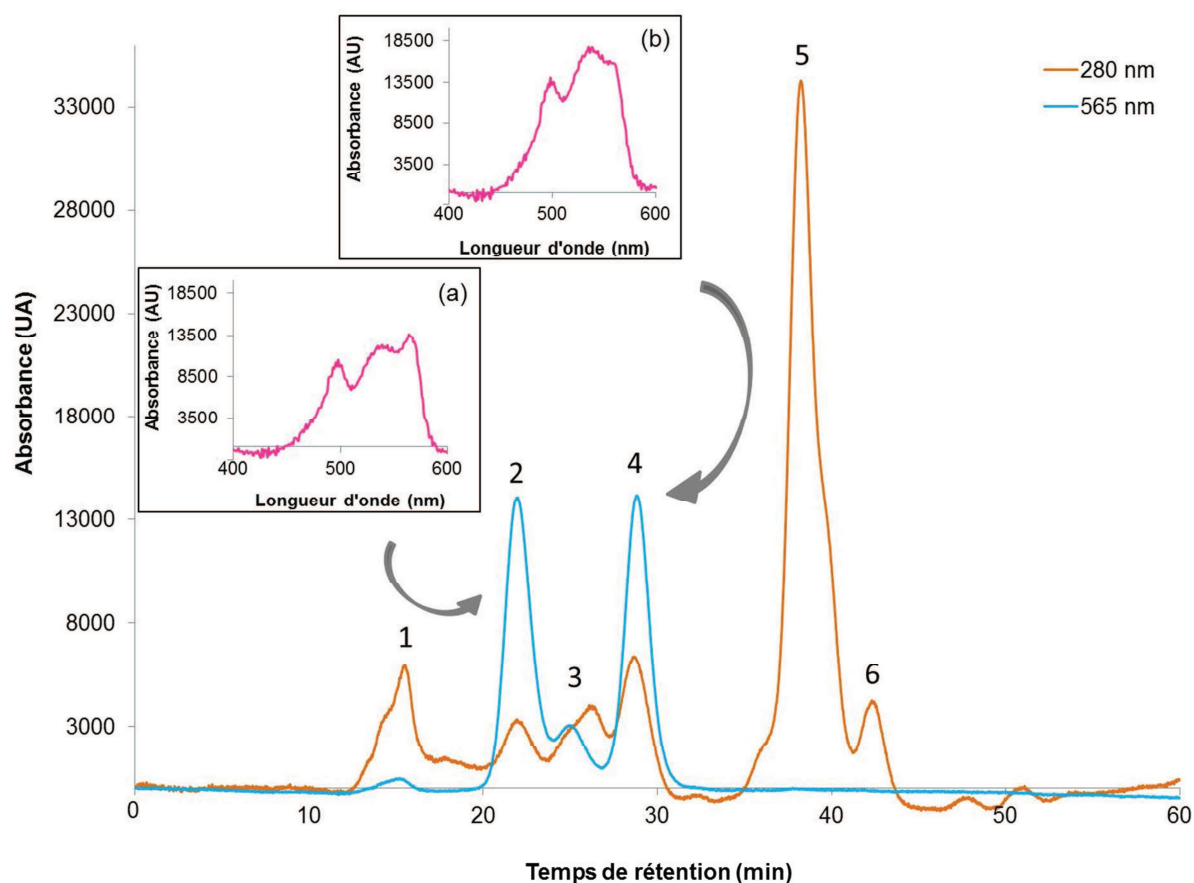
Bien que les IP des extraits protéiques soient significativement différents de l'extrait brut, le gain en pureté engendré par la précipitation au sulfate d'ammonium n'est pas suffisamment intéressant pour que cette étape soit poursuivie. De plus, cette étape induit une perte d'environ 30% de R-PE et elle nécessite de réaliser une dialyse afin de réduire la force ionique des échantillons, induisant alors l'ajout de deux étapes au protocole de purification. Au regard de ces résultats, la précipitation au sulfate d'ammonium, pourtant largement utilisée dans les protocoles de purification, ne s'avère pas intéressante dans un but de purification de la R-PE de *Grateloupia turuturu* et n'a donc pas été retenue.

### 2.2.2. Purification par chromatographie de gel filtration

La chromatographie de gel filtration est utilisée afin de séparer les constituants d'un mélange complexe selon leur masse moléculaire. Cette méthode s'avère beaucoup utilisée dans les protocoles de purification et c'est pourquoi elle a été testée afin de purifier la R-PE de *Grateloupia turuturu*. Ainsi 20  $\mu$ L d'échantillon sont injectés sur une colonne Superdex 200 HR (10 x 300 mm, Amersham) pré-équilibrée avec le tampon phosphate (pH 7,1 ; 20 mM) à un débit de 0,5 mL/min, puis l'élution est réalisée dans les mêmes conditions et la détection à 280 nm et à 565 nm est réalisée.

L'extrait brut de R-PE a été analysé par chromatographie de gel filtration et les chromatogrammes à 280 et 565 nm sont présentés Figure 70.





**Figure 70 : chromatogramme de gel filtration analytique de l'extrait brut à 280 nm (orange) et 565 nm (bleu). (a) spectre d'absorbance du pic 2 ; (b) spectre d'absorbance du pic 4**

L'extrait brut de R-PE présente deux pics d'absorbance à 565 nm majoritaires et six pics à 280 nm. À partir de la droite de calibration, la masse moléculaire apparente de chaque pic a été déterminée. Les résultats sont présentés dans le Tableau XVIII.

**Tableau XVIII : pics obtenus d'après le chromatogramme de l'extrait brut en gel filtration à 280 nm et calculs de leur masse moléculaire apparente d'après l'équation de la droite de calibration**

Pics	Tr (min)	Ve (mL)	Log MM	MM apparente (kD)
1	15,76	7,88	5,97	940000
2	21,91	10,96	5,41	255000
3	24,68	12,34	5,15	142000
4	28,86	14,43	4,77	59000
5	38,08	19,04	3,92	8300
6	42,53	21,27	3,51	3200

NB : Tr = Temps de rétention ; Ve = Volume d'éluion ; MM = Masse Moléculaire

Le pic 2, d'un temps de rétention de 21,9 min, présente une masse apparente d'environ 260 kDa et le pic 4, d'un temps de rétention de 28,9 min, une masse apparente d'environ 60



kDa. Du fait de leur absorbance spécifique à 565 nm, ces deux pics peuvent être identifiés comme étant de la R-PE. Cependant, dans la bibliographie, la R-PE présente une masse d'environ 240 kDa correspondant à une structure oligomérique  $(\alpha\beta)_6\gamma$  (Glazer et Hixson 1977; Hilditch *et al.* 1991; Galland-Irmouli *et al.* 2000). Il est possible que la R-PE de *Grateloupia turuturu* possède une sous-unité supplémentaire, lui conférant une masse plus importante. Dans une étude précédente (D'Agnolo *et al.* 1994), il a été montré que la R-PE de *Gracilaria longa* possède une sous-unité  $\gamma'$  lui conférant une masse apparente de 260 kDa. Les spectres d'absorbance de ces deux pics (Figure 70 (a) et (b)) permettent de voir que la R-PE de 260 kDa présente le pic maximal à 565 nm alors que la R-PE de 60 kDa présente un pic maximal à 540 nm. Ainsi il peut être fait l'hypothèse que le premier pic de 260 kDa correspond à la R-PE native sous la forme d'hexamère alors que le second pic correspond à une forme dissociée (plusieurs sous-unités). En 1967, Nolan et O'hEocha ont rapporté une séparation d'un composé de bas poids moléculaire (45 kDa) à partir d'extraits de phycoérythrine de deux espèces algales sur des colonnes de gel filtration (Sephadex G-100). Plus récemment, deux études ont fait les mêmes observations en chromatographie de gel filtration à partir de la PE de *Nostoc sp.* (Araoz *et al.* 1998) et de l'algue rouge *Iridaea cordata* (MacColl *et al.* 1999). De même en 2012, Pumas *et al.* ont mis en évidence deux formes de C-PE par chromatographie de gel filtration, une forme hexamérique  $(\alpha\beta)_6$  de 235 kDa et une forme trimérique  $(\alpha\beta)_3$  de 125 kDa. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à poursuivre la caractérisation de cette seconde forme de PE.

Cette méthode de purification largement employée et efficace dans la séparation des phycoérythrines des autres composants, n'a pas été retenue pour la purification de la R-PE de *Grateloupia turuturu*. En effet, cette méthode induit une dilution trop importante des fractions purifiées, induisant alors l'ajout d'une étape de concentration du pigment. Elle a par contre été employée à des fins analytiques pour la suite de cette étude.

### 2.2.3. Purification par chromatographie échangeuse d'anions semi-préparative

La chromatographie d'échange d'ions est une méthode efficace et largement utilisée pour la purification de composés hydrosolubles. Il existe deux méthodes : la chromatographie d'échange de cations et la chromatographie d'échange d'anions. Les phycoérythrines ont un pI situé entre 4 et 5 (Hilditch *et al.* 1991; Sun *et al.* 2009; Fu *et al.* 2011). Ainsi à un pH supérieur au pI des phycoérythrines celles-ci sont chargées négativement. Il faut alors utiliser une colonne de chromatographie échangeuse d'anions.

Deux systèmes de gradients existent : le gradient de pH et le gradient de force ionique. Du fait de l'influence du pH sur la stabilité de la R-PE (Chapitre IV), un gradient de force ionique a été retenu plutôt qu'un gradient de pH.

Deux gradients sont habituellement mis en œuvre : un gradient linéaire ou un gradient par palier. Plusieurs tests ont été réalisés afin de déterminer le gradient optimal permettant la séparation et la purification des fractions.

### 2.2.3.1. Gradient linéaire

Plusieurs tests de gradients linéaires ont été réalisés. Trois exemples sont présentés sur la Figure 71 : de 0 à 250 mM, de 0 à 400 mM et de 0 à 500 mM de NaCl en 30 min. Pour chaque gradient, deux pics d'absorbance à 565 nm sont observés mais aucun gradient ne permet de séparer ces deux pics. L'éluion par gradient linéaire n'a donc pas été retenue pour la purification de la R-PE de *Grateloupia turuturu*.

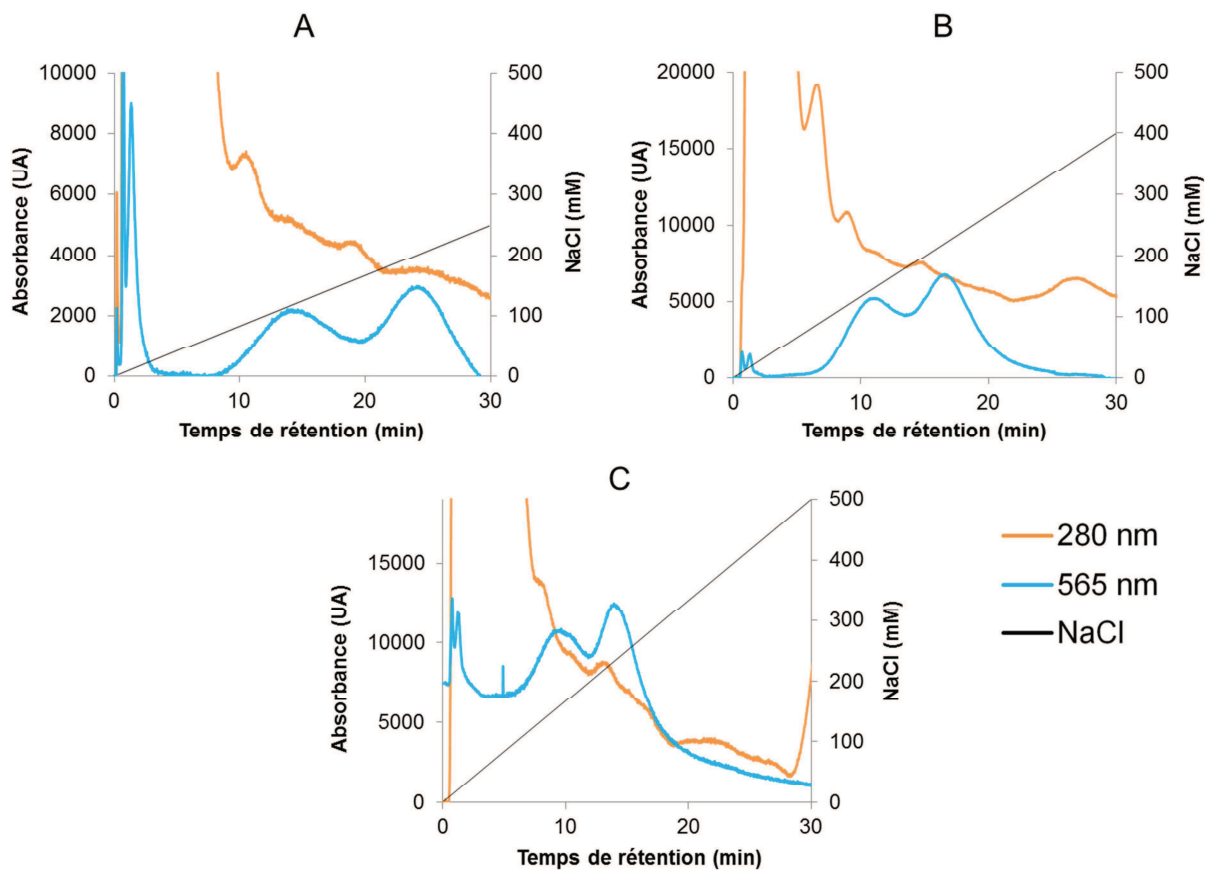


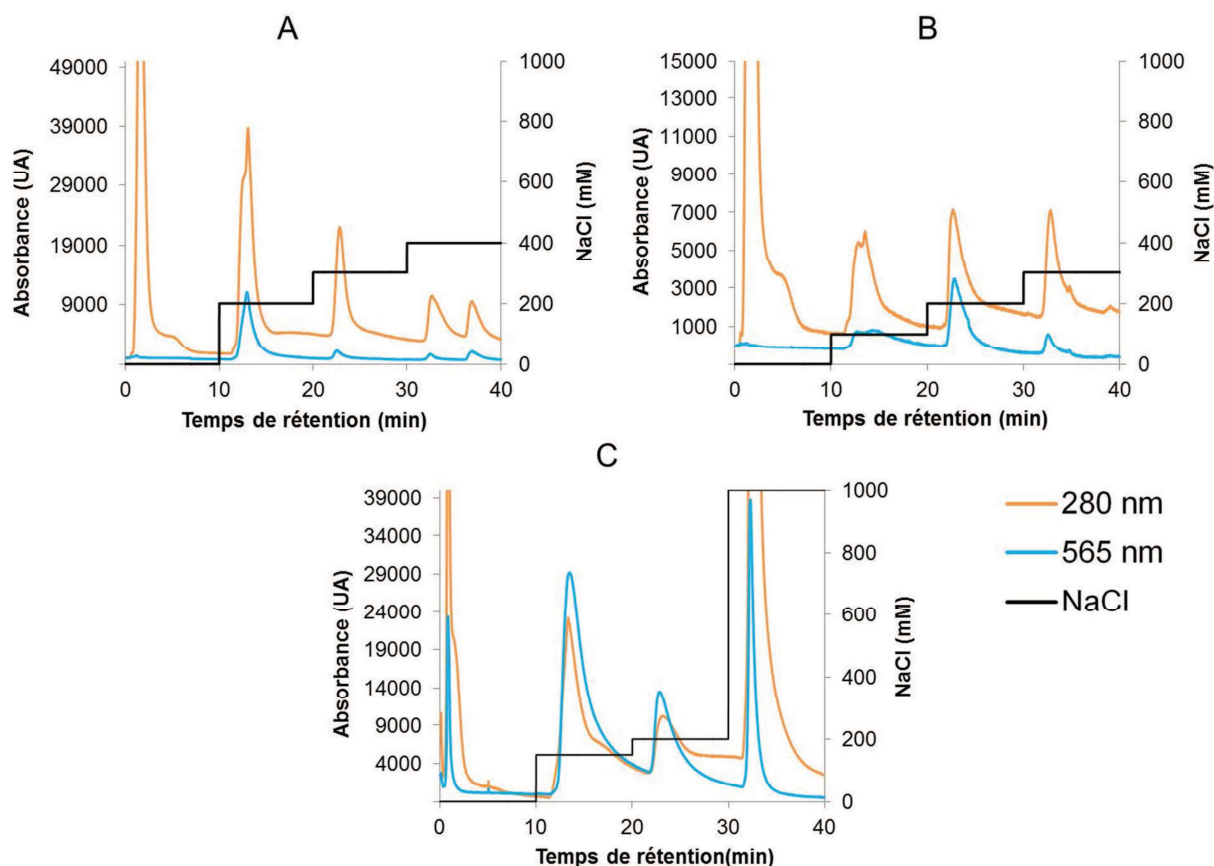
Figure 71 : chromatogrammes d'échange d'anions de l'extrait brut élué avec un gradient linéaire. A : 0 à 250 mM en 30 min ; B : 0 à 400 mM en 30 min ; C : 0 à 500 mM en 30 min

### 2.2.3.2. Gradient par paliers

Différents gradients par paliers ont été mis en œuvre dans le but de séparer les composés de l'EB riche en R-PE. Trois exemples de chromatogrammes sont présentés Figure 72.

Dans un premier temps, un gradient par paliers de 200, 300 et 400 mM de NaCl a été mis en œuvre (Figure 72 A). Un pic majoritaire absorbant à 565 nm est élué au palier de 200 mM. La fraction éluée au cours de ce palier contenant une part importante de protéines (pic majoritaire à 280 nm), ce gradient n'a pas été retenu.

Un deuxième gradient par paliers a été testé avec les paliers suivants : 100 mM, 200 mM puis 300 mM NaCl (Figure 72 B). Le pic majoritaire absorbant à 565 nm est élué au cours du palier de 200 mM. Deux autres pics d'intensité moindre, sont observables aux paliers de 100 mM et de 300 mM.



**Figure 72 : chromatogrammes d'échange d'anions de l'extrait brut élué selon un gradient par paliers. A : 0-200-300-400 mM NaCl ; B : 0-100-200-300 mM NaCl ; C : 0-150-200-1000 mM NaCl**

Un autre gradient a été mis en œuvre avec les paliers suivants : 150 mM, 200 mM et 1000 mM (Figure 72 C). Chaque palier permet d'obtenir une fraction absorbant à 565 nm. Ainsi ce gradient par palier permet la séparation de plusieurs formes de R-PE. Celles-ci sont éluées à des forces ioniques différentes, indiquant alors que ces formes de R-PE possèdent une

charge globale nette différente. Ces trois fractions sont alors collectées à 150 mM, 200 mM et 1000 mM de NaCl et sont respectivement appelées EA-150, EA-200 et EA-1000 et analysées par spectrophotométrie d'absorbance et de fluorescence et par chromatographie de gel filtration. Afin d'être analysées en SDS-PAGE, les fractions obtenues après purification de l'EB par chromatographie échange d'anions, sont dialysées 12 heures contre du tampon phosphate (pH 7,1 ; 20 mM) dans des membranes de cellulose régénérée d'un seuil de coupure de 3,5 kDa (Spectra/por Regenerated Cellulose 3.5 kDa). Deux bains sont réalisés afin d'amener la concentration en sels inférieure à 20 mM. Les fractions dialysées sont ensuite lyophilisées.

Le protocole de purification mis au point à partir de ces expérimentations est présenté Figure 73.

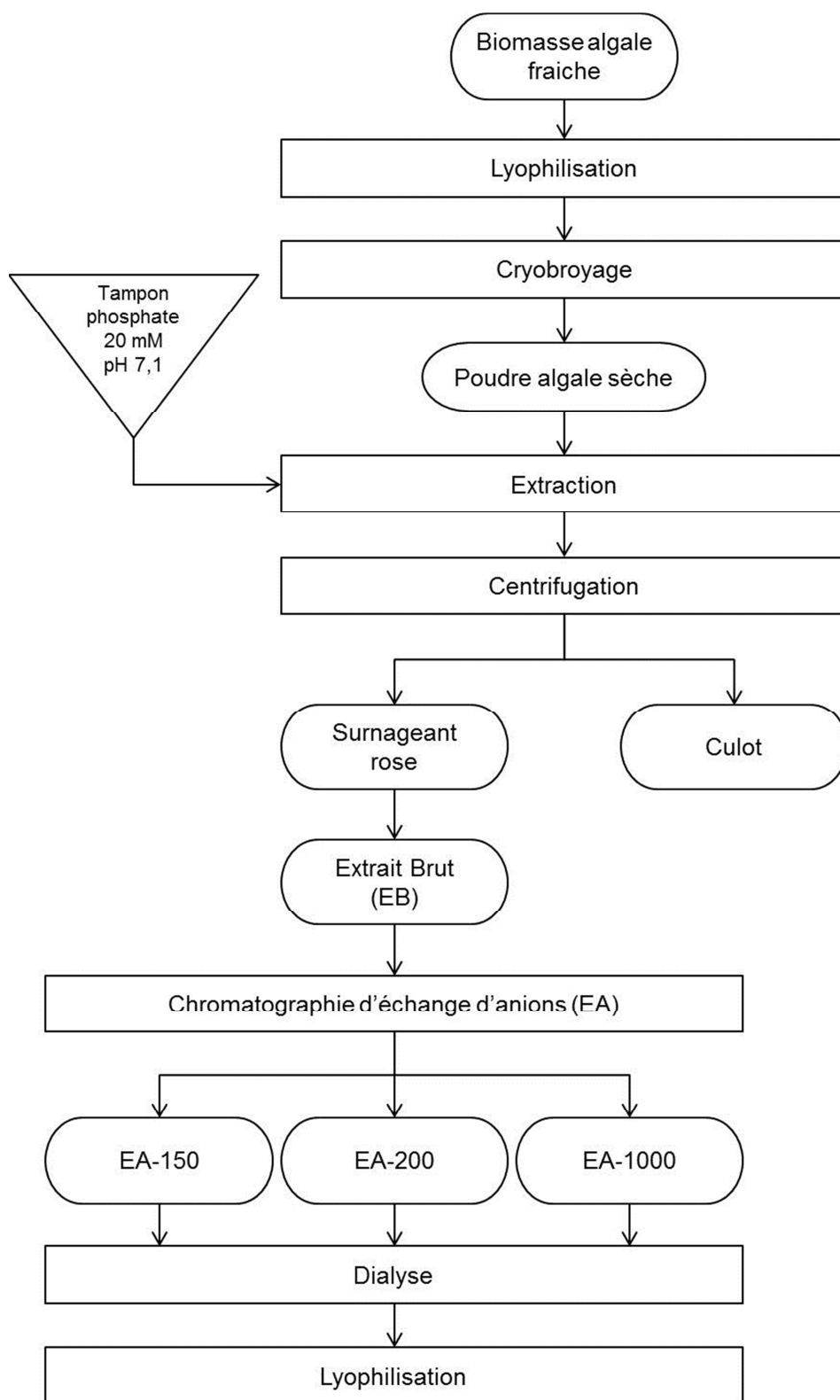


Figure 73 : représentation schématique du protocole d'extraction et de purification de la R-PE de *Grateloupia turuturu* par chromatographie d'échange d'anions semi-préparative.

EA-150 = fraction éluée à 150 mM de NaCl ; EA-200 = fraction éluée à 200 mM de NaCl ; EA-1000 = fraction éluée à 1 M de NaCl

### 2.3. Caractérisation de l'extrait brut et des fractions

L'extrait brut et les fractions obtenues sont analysés par spectrophotométrie, fluorimétrie, chromatographie de gel filtration analytique et SDS-PAGE. Ils sont également caractérisés biochimiquement par dosage de la R-PE, des sucres et des protéines hydrosolubles.

Le spectre d'absorbance de l'extrait brut est présenté Figure 74. Ce spectre présente les pics caractéristiques de la R-PE à 565, 540 et 498 nm. Le rendement d'extraction en R-PE a été déterminé à  $5,28 \text{ mg.g}^{-1}$  MS et l'indice de pureté à 0,41 (Tableau XIX). De plus cet extrait brut possède un maximum de fluorescence à 575 nm qui est le  $\lambda_{\text{em}}$  maximal de la R-PE (Figure 74).

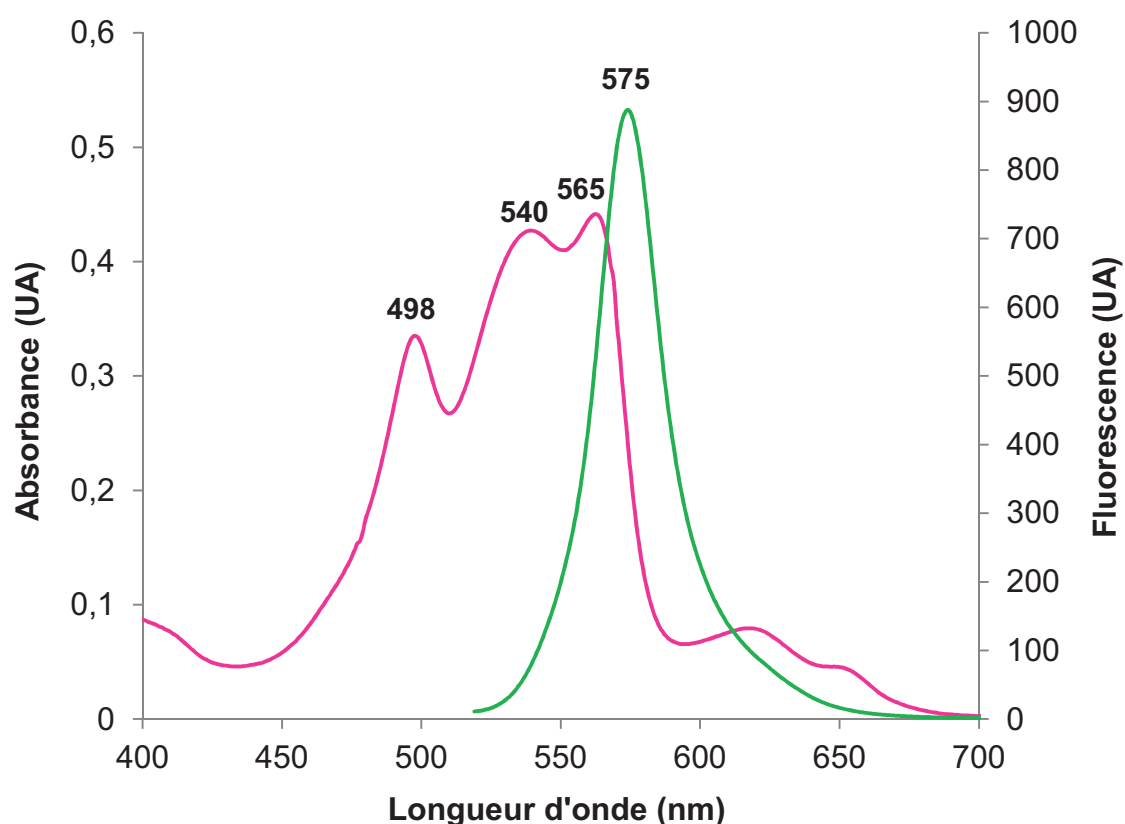


Figure 74 : spectre d'absorbance (rose) et de fluorescence (vert) de l'extrait brut  
( $\lambda_{\text{ex}} = 498 \text{ nm}$ )

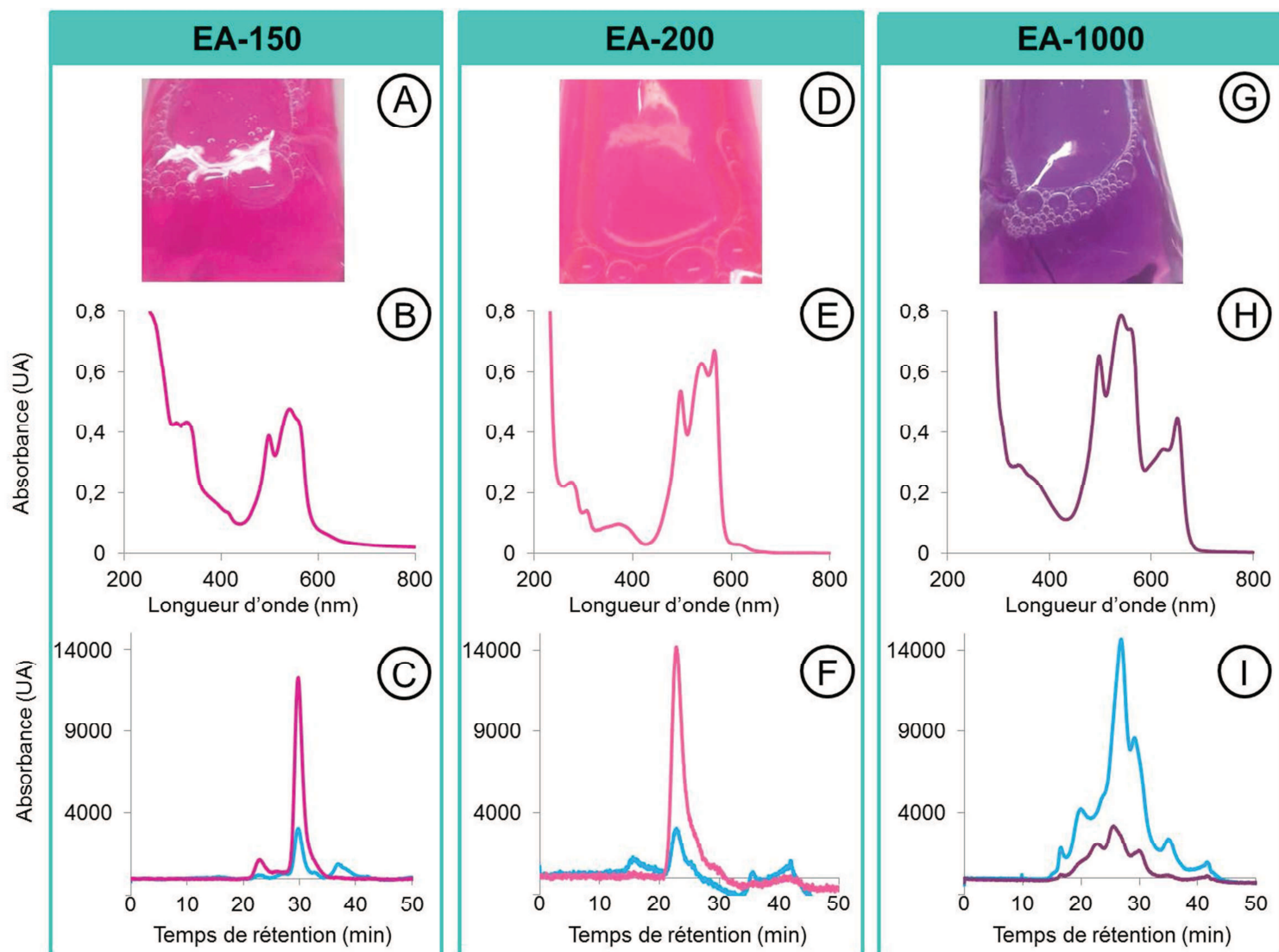


Figure 75 : coloration (A, D et G), spectres d'absorbance (B, E et H) et chromatogrammes de gel filtration (C, F et I) des fractions obtenues après l'étape de purification



La Figure 75 présente la coloration, les spectres d'absorbance et les chromatogrammes de gel filtration des fractions obtenues après l'étape de purification. La fraction EA-150, de couleur rose (Figure 75 A), ne présente pas de maximum à 565 nm sur le spectre d'absorbance (Figure 75 B). De plus, deux pics sont observés en chromatographie de gel filtration à 565 nm, le plus important correspondant à la R-PE dissociée de 60 kDa (Figure 75 C). En ce qui concerne la fraction EA-200, de couleur rose (Figure 75 D), elle possède un maxima d'absorption à 565 nm (Figure 75 E). Elle présente un seul pic à 565 nm en chromatographie de gel filtration correspondant à la R-PE native de 260 kDa (Figure 75 F). Au niveau de la fraction EA-1000, de couleur violette (Figure 75 G), celle-ci est riche en R-PE dénaturée, car le pic à 565 nm est absent, mais aussi en phycocyanine ( $\lambda_{\max} = 620$  nm) et en allophycocyanine ( $\lambda_{\max} = 650$  nm) (Figure 75 H). De plus, en chromatographie de gel filtration, il y a présence de plusieurs pics mal séparés absorbant fortement à 280 nm (Figure 75 I).

Ainsi la fraction d'intérêt correspond à la fraction EA-200. Ceci suggère que les phycobiliprotéines peuvent être séparées selon leur charge nette et que si elles possèdent des charges globales différentes, elles doivent aussi présenter des pI différents. Les indices de pureté et le rendement en R-PE peuvent être calculés à partir des spectres d'absorption (Tableau XIX).

**Tableau XIX : indices de pureté, rendements et volume de R-PE et caractérisation biochimique (protéines et sucres hydrosolubles) de l'extrait brut et des fractions obtenues après purification par chromatographie d'échange d'anions**

Noms des fractions	Étapes	Chromatographie échangeuse d'anions			
	Extraction EB	EA-150	EA-200	EA-1000	
Volume de la fraction (mL)	50	40	80	40	
IP ( $A_{565}/A_{280}$ )	0,41	0,66	2,89	0,33	
Ratio $A_{565}/A_{498}$	1,29	1,03	1,25	1,08	
Ratio $A_{620}/A_{565}$	0,18	0,16	0,04	0,48	
Ratio $A_{650}/A_{565}$	0,10	0,10	0,01	0,64	
Rendement d'extraction ( $\text{mg.g}^{-1}$ MS)	5,28	0,35	1,41	0,52	
Rendement de purification (%)	100	7	27	10	
Protéines hydrosolubles ( $\text{mg.g}^{-1}$ MS) <sup>NB</sup>	12,49 ± 0,67 (100%)	1,34 ± 0,14 (11%)	2,47 ± 0,18 (20%)	2,67 ± 0,11 (21%)	
Sucres hydrosolubles ( $\text{mg.g}^{-1}$ MS) <sup>NB</sup>	33,78 ± 2,78 (100%)	0,55 ± 0,05 (1,6%)	1,63 ± 0,13 (4,8%)	3,51 ± 0,93 (10,4%)	

NB : les données sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=9).

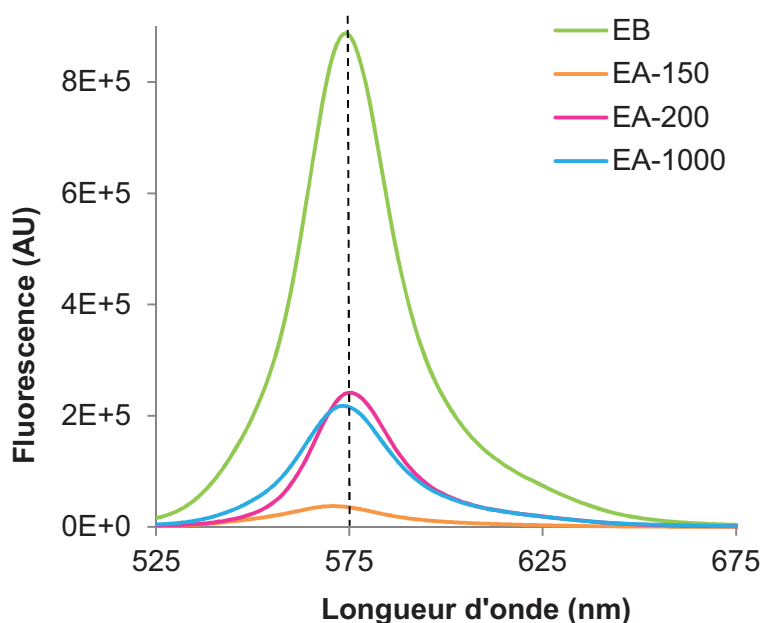
Comme le montre le Tableau XIX, après purification, la fraction EA-200 possède à elle seule 27% de la R-PE par rapport à l'extrait brut initial. De plus cette fraction présente un IP de 2,89 ce qui correspond à une augmentation de plus de sept fois par rapport à l'IP de l'EB. Le critère de pureté communément accepté est lorsque  $A_{565}/A_{280} > 3,2$  (Niu *et al.* 2006). La fraction obtenue dans notre étude présente un ratio légèrement inférieur correspondant ainsi à de la R-PE partiellement purifiée. Les ratios de pureté au regard de la phycocyanine et de l'allophycocyanine sont respectivement de 0,04 et de 0,01. Ces ratios sont faibles, témoignant alors une pureté de la R-PE vis-à-vis de ces deux pigments. En ce qui concerne le ratio  $A_{565}/A_{498}$ , celui-ci est de 1,25 ce qui est similaire à celui de l'extrait brut (1,29). Cela suggère que la fraction EA-200 correspond essentiellement à la forme hexamérique  $(\alpha\beta)_6\gamma$  de la R-PE. Par contre, la fraction EA-150 correspond à la forme trimérique  $(\alpha\beta)_3$  puisque le ratio  $A_{565}/A_{498}$  (1,03) est inférieur à celui de l'EB (1,29). Il en est de même pour la fraction EA-1000.

En ce qui concerne la composition biochimique (sucres et protéines), on constate qu'au cours de l'étape de purification par chromatographie d'échange d'anions la fraction EA-200 ne contient plus que 20% du contenu en protéines hydrosolubles de l'EB, soit  $2,47 \pm 0,18$  mg.g<sup>-1</sup> MS. De plus, près de la moitié du contenu de la fraction EA-200 en protéines hydrosolubles correspond à la R-PE. Ainsi on peut considérer qu'il y a seulement 8,5% de protéines hydrosolubles de l'EB autres que la R-PE dans la fraction EA-200. Cette étape permet également d'éliminer la majorité des sucres (83%). Les fractions EA-150 et EA-1000 ne sont pas retenues dans un objectif de purification de la R-PE, du point de vue de l'IP et du rendement d'extraction obtenus. Cependant, il serait intéressant de poursuivre la caractérisation de ces fractions afin de comprendre et d'expliquer les différences structurales entre la R-PE native de 260 kDa et la forme de 60 kDa.

Les spectres de fluorescence de l'EB et des trois fractions sont présentés Figure 76. À l'instar de l'EB, la fraction EA-200 présente un maximum de fluorescence à 575 nm, alors que les fractions EA-150 et EA-1000 présentent un maximum à 570 nm. Les différences d'intensité sont dues à des différences de concentration, l'EB étant beaucoup plus concentré en R-PE que les fractions.

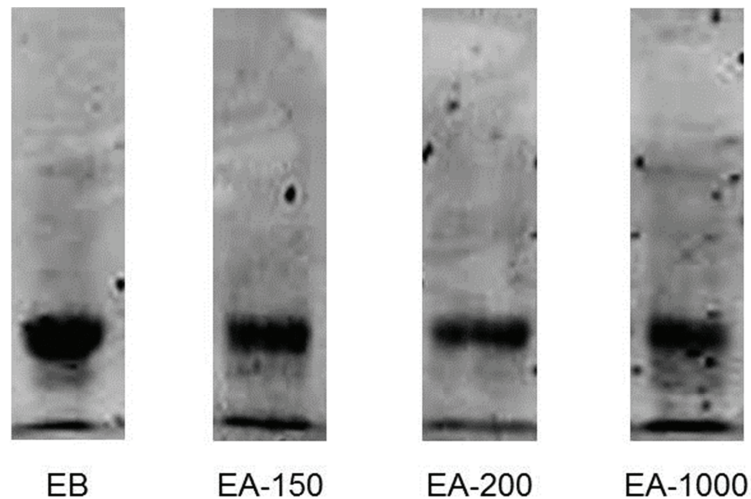
Ceci montre que la forme dissociée de R-PE, présente un décalage de son  $\lambda_{max}$  par rapport à la forme native. Les propriétés d'absorbance de la R-PE dissociée ainsi que les propriétés de fluorescence sont modifiées. Ceci peut être dû à la perte de chromophores PEB et PUB portés par les différentes sous-unités, puisqu'ils participent à l'émission de fluorescence par transfert d'énergie des chromophores PUB vers les chromophores PEB. Ce décalage de 5 nm peut également être dû à des modifications des distances séparant les chromophores.

Cette observation est en concordance avec le ratio  $A_{565}/A_{498}$  calculé (Tableau XIX). En effet, le pic d'absorbance à 565 nm étant dû au chromophore PEB et le pic d'absorbance à 498 nm étant dû au chromophore PUB, ce ratio révèle la dominance de l'un ou de l'autre chromophore. Ainsi, la fraction EA-200 d'un ratio de 1,27 témoigne de la dominance du chromophore PEB. Pour la fraction EA-150, ce ratio est plus faible (1,03) témoignant donc de la « perte » de chromophores PEB, également responsables de la fluorescence.



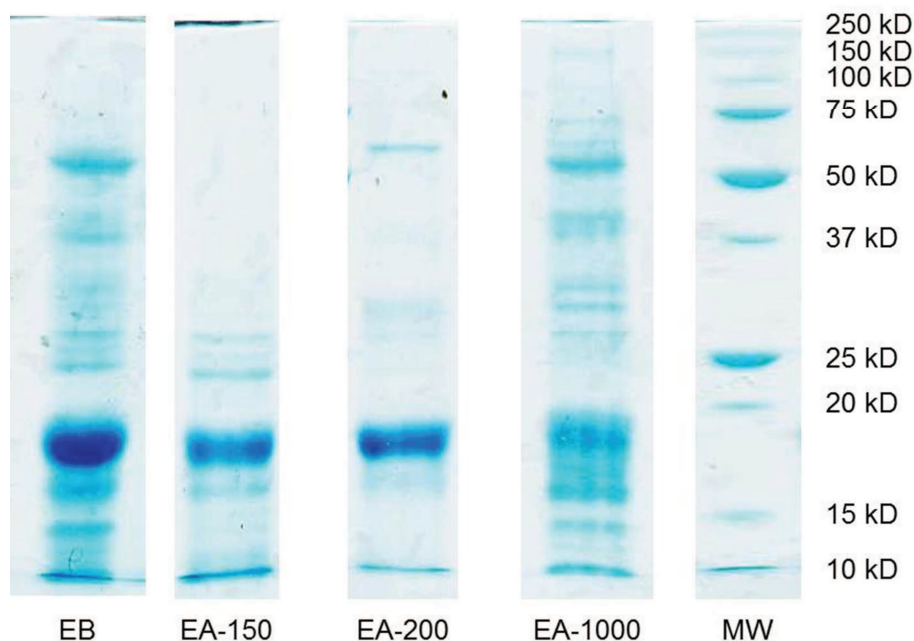
**Figure 76 : spectres de fluorescence de l'extrait brut et des fractions obtenues après purification par chromatographie d'échange d'anions.  $\lambda_{ex} = 498$  nm**

L'analyse par électrophorèse en conditions dénaturantes et révélée par fluorescence, présentée en Figure 77, permet de visualiser une intense bande fluorescente due à la présence de la R-PE et ce aussi bien dans l'extrait brut que dans les fractions purifiées. C'est cette propriété qui est à l'origine de l'utilisation de la R-PE comme marqueur fluorescent.



**Figure 77 : profils électrophorétiques en conditions dénaturantes de l'extrait brut et des fractions obtenues après purification et dialyse et révélés par fluorescence**

L'analyse par électrophorèse en conditions dénaturantes et révélée au bleu de Coomassie, présentée Figure 78, permet de visualiser l'efficacité de la purification ainsi que la présence de contaminants dans les différentes fractions et permet d'évaluer la masse moléculaire relative des bandes d'intérêt.



**Figure 78 : profils électrophorétiques en conditions dénaturantes de l'extrait brut et des fractions obtenues après purification et dialyse et révélés au bleu de Coomassie. MW = Marqueurs de taille**

De nombreuses bandes témoignant de la richesse en protéines sont présentes au niveau de l'extrait brut. La fraction EA-200 présente une large bande de taille comprise entre 18 et 21

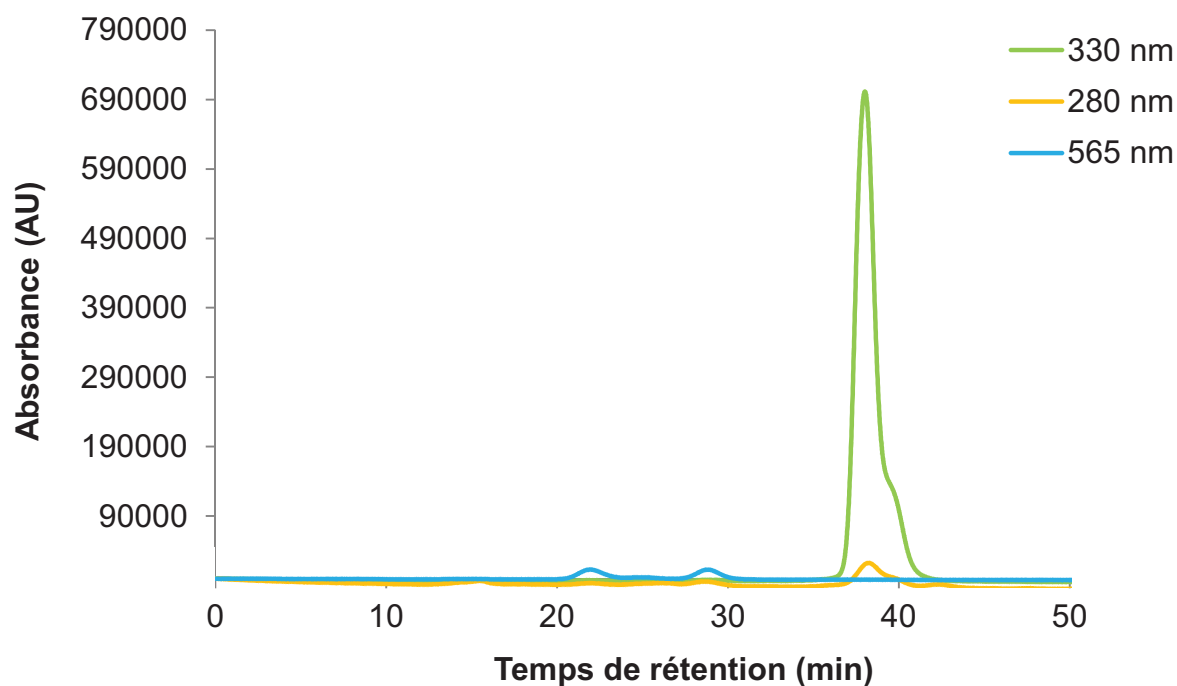
kDa. Cette bande est également présente dans l'extrait brut et dans la fraction EA-150, ainsi que dans la fraction EA-1000 mais celle-ci est de moindre intensité. Cette bande correspond aux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . La fraction EA-200 présente une bande de faible intensité de 29 kDa correspondant à la sous-unité  $\gamma$ . On dénote la présence d'une légère bande de 27 kDa située en dessous de la bande correspondant à cette sous-unité  $\gamma$ , suggérant peut-être la présence d'une sous-unité  $\gamma'$  observée chez quelques R-PE (Sun *et al.* 2009). Une autre bande est visible pour cette fraction, observée également dans l'EB et la fraction EA-1000, elle possède une taille d'environ 61 kDa. Il doit s'agir d'un agrégat de sous-unités non dénaturé. Ces observations sont en accord avec celles rapportées dans de nombreuses autres études (Hilditch *et al.* 1991; Galland-Irmouli *et al.* 2000; Rossano *et al.* 2003; Liu *et al.* 2005; Niu *et al.* 2006). Les autres bandes observées correspondent pour certaines, aux polypeptides de liaisons. Ceux qui sont constitutifs du phycobilisome sont de masse moléculaire supérieure aux sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  et se situent entre 25 000 et 120 000 Da (groupes I et II). On observe effectivement des bandes dans cette gamme de taille. D'autres sont de plus petite taille (9 à 12 kDa = groupe IV) que les sous unités des phycobiliprotéines et permettent l'assemblage et la fixation du centre du phycobilisome. On observe également des bandes dans cette gamme de taille.

Cette méthode permet de visualiser l'efficacité de la purification de l'extrait brut et permet de faire l'hypothèse d'une structure  $(\alpha\beta)_6\gamma\gamma'$  de la R-PE de *Grateloupia turuturu*, ce qui est suggéré pour d'autres PE. Cela n'a jamais été montré à ce jour. De plus ces méthodes ont permis de caractériser deux autres fractions qui pourraient être également valorisées. Une fraction de R-PE d'une masse apparente de 60 kDa ainsi qu'une fraction enrichie en phycocyanine et allophycocyanine.

#### **2.4. Autres composés d'intérêt**

La chromatographie de gel filtration couplée à un détecteur à barrettes de diode (UV-DAD) permet de visualiser les profils chromatographiques pour des longueurs d'ondes situées entre 200 et 800 nm et ce tout le long de l'analyse. Ainsi des profils chromatographiques en 3D (Annexe 3) ont pu être obtenus et ont permis de révéler la présence de composés absorbant fortement à 330 nm (Figure 79).

D'après la droite de calibration de la chromatographie de gel filtration, ces composés se situent en dehors de la zone linéaire. Il n'est donc pas possible de déterminer leur taille.



**Figure 79 : profils chromatographiques à 330 nm (vert), 280 nm (orange) et 565 nm (turquoise) de l'extrait brut en chromatographie de gel filtration**

D'après la littérature, ces composés polaires intracellulaires de petite taille (< 400 Da) absorbant fortement à 330 nm, s'avèrent être des acides aminés de type mycosporine ou MAAs en anglais pour Mycosporine-like Amino Acids (Kim 2011). Ces métabolites secondaires ont été mis en évidence dans de nombreux organismes marins. Ils ont deux fonctions majeures : ils agissent comme filtres UV photo-protecteurs (Adams et Shick 1996; Neale *et al.* 1998; Adams et Shick 2001) et également comme antioxydants (Dunlap et Yamamoto 1995). Ces deux propriétés leur confèrent donc un fort potentiel pour les applications cosmétiques (Bandaranayake 1998; Zhang *et al.* 2007) comme protecteurs UV et comme activateurs de la prolifération cellulaire. Plusieurs brevets ont été déposés (de la Coba *et al.* 2007). De nombreuses algues synthétisent ces composés qui possèdent une forte absorption dans la zone UV (Carreto et Carignan 2011). Le maximum d'absorbance se situe entre 320 et 360 nm (Bandaranayake 1998). Parmi les macroalgues, les plus fortes concentrations et diversités sont observées chez les Rhodophycées (Huovinen *et al.* 2004; Korbee *et al.* 2005a; Korbee *et al.* 2005b; Huovinen *et al.* 2006).

Une étude précédente a montré que *Grateloupia turuturu* synthétise ces MAAs. À plus de 90%, elle synthétise la shinorine et les 10% restants correspondent à la palythine (Figueroa *et al.* 2007). Ces MAAs ont également été mises en évidence dans d'autres algues rouges appartenant au genre *Gracilaria* (Cardozo *et al.* 2011).



D'après ces observations, il serait intéressant de poursuivre la valorisation de *Grateloupia turuturu* également au travers de ces molécules à haut potentiel. Elles peuvent être facilement isolables de la R-PE en chromatographie de gel filtration puisqu'elles ne sont éluées que plus tardivement. Elles constituent donc une autre voie de valorisation pour l'industrie cosmétique, pour le développement de produits solaires.

Par ailleurs, du point de vue fondamental, il serait intéressant de poursuivre l'étude de ces composés pour étudier le lien entre leur synthèse et les facultés adaptatives de *Grateloupia turuturu*.

### 3. Conclusion

La spectrophotométrie d'absorbance et de fluorescence, la chromatographie de gel filtration et l'électrophorèse en condition dénaturante, permettent de confirmer que la chromatographie d'échange d'anions conduit à une purification de la R-PE (forme native de 260 kDa) mais également à une séparation de deux formes de R-PE (forme native et forme dissociée). À notre connaissance, cela n'a jamais été mis en évidence dans une étude précédente. Seules quelques études ont révélé la présence d'un second pic en chromatographie de gel filtration mais sans jamais l'expliquer ni l'étudier (MacColl *et al.* 1996; Araoz *et al.* 1998).

Habituellement, les méthodes de purification de phycobiliprotéines sont complexes et consommatrices de temps. Après extraction du matériel algal, plusieurs étapes sont réalisées, incluant une précipitation au sulfate d'ammonium, une ultrafiltration, une ou plusieurs chromatographies de gel filtration, d'échange d'ions et d'hydroxyapatite. En comparaison avec ces méthodes, le protocole mis au point dans cette présente étude ne fait intervenir qu'une seule étape de purification. Il permet d'éliminer de nombreuses étapes et aboutit à la production d'un extrait protéique concentré et partiellement purifié. En effet, ce protocole a permis d'obtenir une R-PE native d'un indice de pureté de 2,89 soit 7,5 fois plus important que l'indice de pureté de l'extrait brut initial et d'un rendement de 1,41 mg.g<sup>-1</sup> MS (soit 27% du l'extrait brut). Des résultats similaires ont été obtenus à partir de l'algue rouge *Polysiphonia urceolata*. Ce protocole a permis d'obtenir un pigment d'un IP de 3,26 en deux étapes de purifications que sont la chromatographie de gel filtration et d'échange d'anions, avec un rendement de récupération de 25% (Niu *et al.* 2006).

Plusieurs perspectives s'ouvrent alors. L'analyse des deux formes de R-PE par spectrophotométrie de masse et par RMN permettrait de mettre en évidence les différences entre ces deux formes. Notamment de déterminer les sous-unités qui les composent et d'expliquer l'origine de cette forme dissociée de R-PE.



L'étude comparée de cette fraction de R-PE purifiée à partir de *Grateloupia turuturu* et de R-PE issues d'autres espèces d'algues rouges, permettrait de déceler des différences structurales entre ces PEs et ainsi d'éventuellement mettre en évidence un lien entre les propriétés structurales des PEs et le caractère proliférant ou non d'une espèce.

Il serait également intéressant de poursuivre l'étude de la forme dissociée de R-PE afin de valoriser cette fraction de plus petite taille, aux propriétés de coloration, d'absorbance et de fluorescence intéressantes.

Dans de nombreuses études de purification de phycobiliprotéines, des protectants sont ajoutés au tampon d'extraction en vue d'optimiser les conditions expérimentales. Ainsi, l'étude suivante s'est intéressée à montrer l'effet de l'ajout de protectants au tampon d'extraction sur des extraits bruts de R-PE.

Sur le plan valorisation de la R-PE comme colorant alimentaire, le second volet du chapitre suivant a pour objet l'étude de l'effet de l'ajout de conservateurs alimentaires sur la stabilité d'extraits bruts de R-PE.



## **Chapitre VI : Influence de protectants et conservateurs alimentaires sur la stabilité de la R-PE de *Grateloupia turuturu***

### **1. Contexte de l'étude**

La R-PE, et plus largement les phycobiliprotéines, peuvent être utilisées dans de nombreuses applications pour leurs propriétés spectrales, fluorescentes et colorantes (Dufossé *et al.* 2005). Ainsi la R-PE peut être utilisée comme marqueur fluorescent pour les méthodes diagnostiques en immunologie, biologie cellulaire, et recherche médicale (Sekar et Chandramohan 2008). Elle peut également être intégrée à des produits cosmétiques ou alimentaires pour ses propriétés colorantes. Pour l'industrie alimentaire, elle peut être intégrée dans des sucreries, chewing-gums, boissons comme colorant alimentaire (Dufossé *et al.* 2005). Une des limites à son utilisation est sa sensibilité dans le temps à la lumière, à l'oxydation, à l'humidité, à la température. Ainsi il est nécessaire d'étudier l'impact de l'ajout de protectants et de conservateurs alimentaires non toxiques pour les consommateurs. Les protectants sont toxiques pour l'homme, ils présentent un intérêt uniquement pour les applications comme marqueur fluorescent (Mishra *et al.* 2008). Les conservateurs alimentaires sont indispensables pour assurer la sécurité sanitaire de produits alimentaires, ou afin de maintenir les additifs et le produit alimentaire stables dans le temps.

Dans un premier temps, cette étude décrit les effets de protectants que sont l'azide de sodium, l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) et le 2-mercaptoéthanol sur l'extraction de la R-PE de *Grateloupia turuturu* dans le but de stabiliser le pigment pour son étude en recherche fondamentale. D'autre part, les effets dans le temps de conservateurs alimentaires que sont le chlorure de sodium (NaCl), le saccharose, le chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>), l'acide citrique et l'acide ascorbique sur la stabilité de la R-phycoérythrine ont été étudiés pour une application de la R-PE en tant que colorant alimentaire ; l'objectif étant d'augmenter la stabilité de la R-PE afin de pouvoir l'intégrer dans des produits alimentaires.

### **2. Etude de l'utilisation de protectants sur l'extraction de la R-PE de *Grateloupia turuturu***

L'azide de sodium, le 2-mercaptoéthanol et l'EDTA ont été utilisés pour leurs propriétés protectrices. L'azide de sodium (ou azoture de sodium) possède d'excellentes propriétés biocides et est utilisé comme agent de conservation, en faible concentration, dans certaines solutions d'analyse (réactifs de tests diagnostiques) et fluides biologiques (échantillons de

sérum, d'anticorps pour la recherche en immunologie par exemple (Société Chimique de France 2013). Il agit comme découplant de la phosphorylation oxydative au niveau de la chaîne respiratoire empêchant alors le développement bactérien (Guimond 2004). Il est hautement toxique pour l'homme et néfaste pour l'environnement (Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail 2013a). Le 2-mercaptoéthanol (ou  $\beta$ -mercaptoéthanol) est un réducteur des ponts disulfures présents dans les protéines qui est très utilisé en biochimie pour protéger celles-ci de l'oxydation (Garrett *et al.* 2000). Il est également toxique pour l'homme et pour l'environnement (Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail 2013c). L'EDTA possède un fort pouvoir chélatant, en particulier envers les ions magnésium ( $Mg^{2+}$ ), permettant ainsi d'inhiber les métallo-enzymes et de limiter l'hydrolyse des protéines. De plus il est utilisé dans les domaines de l'agroalimentaire et de la cosmétique comme stabilisateur vis-à-vis de la dégradation par les bactéries (INERIS 2013). Il est également toxique pour l'homme (Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail 2013b).

Ces trois protectants sont utilisés dans de nombreuses études biochimiques et notamment dans des études portant sur l'extraction des phycobiliprotéines (Glazer et Hixson 1975; Bryant *et al.* 1976; Liu *et al.* 2005; Niu *et al.* 2006; Sun *et al.* 2009). Ce travail consiste à étudier l'effet de protectants seuls ou en mélange sur l'extraction de la R-PE de *Grateloupia turuturu*.

## 2.1. Protocole de l'étude

Les protectants présentés ci-dessus ont été ajoutés au tampon phosphate (pH 7,1 ; 20 mM) en mélange et seuls dans les concentrations suivantes (Tableau XX) :

**Tableau XX : concentrations finales des protectants ajoutés au tampon d'extraction**

Protectant	Concentration finale
Azide de sodium	4 mM
2-mercaptoéthanol	5 mM
EDTA	2 mM

Ces concentrations ont été choisies car elles correspondent aux concentrations les plus élevées qui sont retrouvées dans la littérature. En 2009, Sun *et al.* ont mis au point un protocole de purification de la R-PE de l'algue *Heterosiphonia japonica* en ajoutant de l'azide de sodium à 4 mM, du  $\beta$ -mercaptoéthanol à 2 mM et de l'EDTA à 2 mM en mélange. Dans les autres articles de purification de phycobiliprotéines, il s'agit essentiellement d'ajout

d'azide de sodium seul (Bryant 1982). Pour ces raisons, nous avons testé l'effet de ces protectants seuls et en mélange sur la R-PE.

Pour chaque condition, trois extractions ont été réalisées et l'extrait obtenu a été analysé par spectrophotométrie et par chromatographie de gel filtration.

## 2.2. Résultats et discussion de l'étude

### 2.2.1. Protectants seuls

La Figure 80 montre le spectre d'absorbance de l'extrait brut sans protectant et ceux avec le 2-mercaptoéthanol, l'EDTA et l'azide.

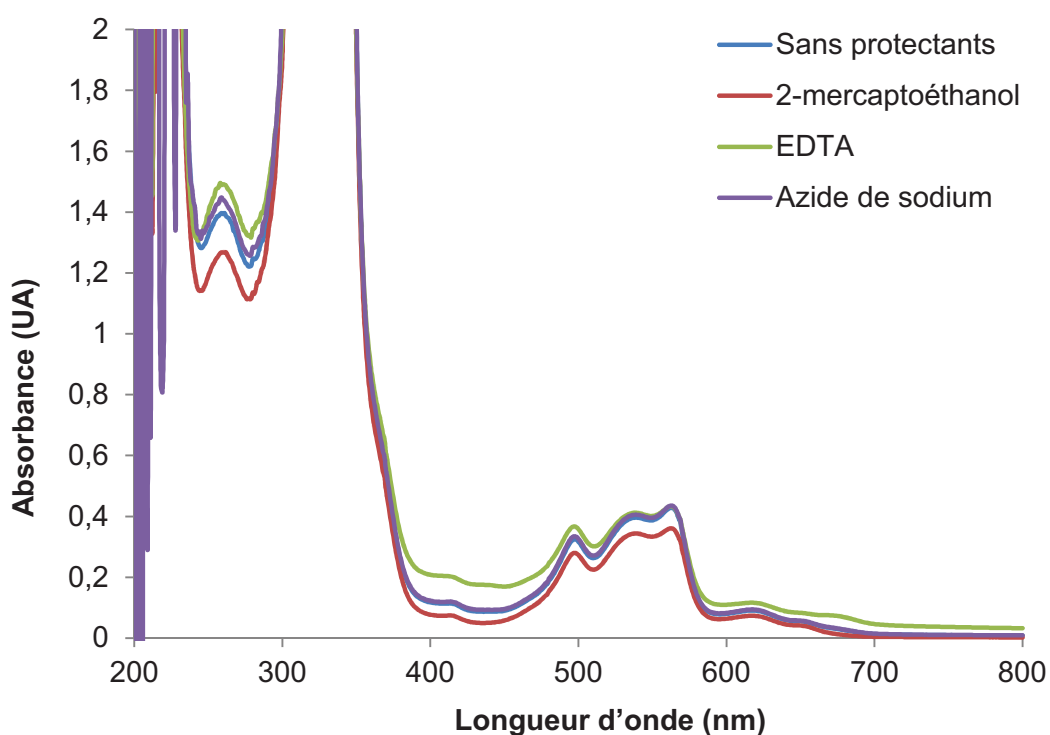


Figure 80 : spectres d'absorbance des extraits bruts obtenus avec ou sans protectants

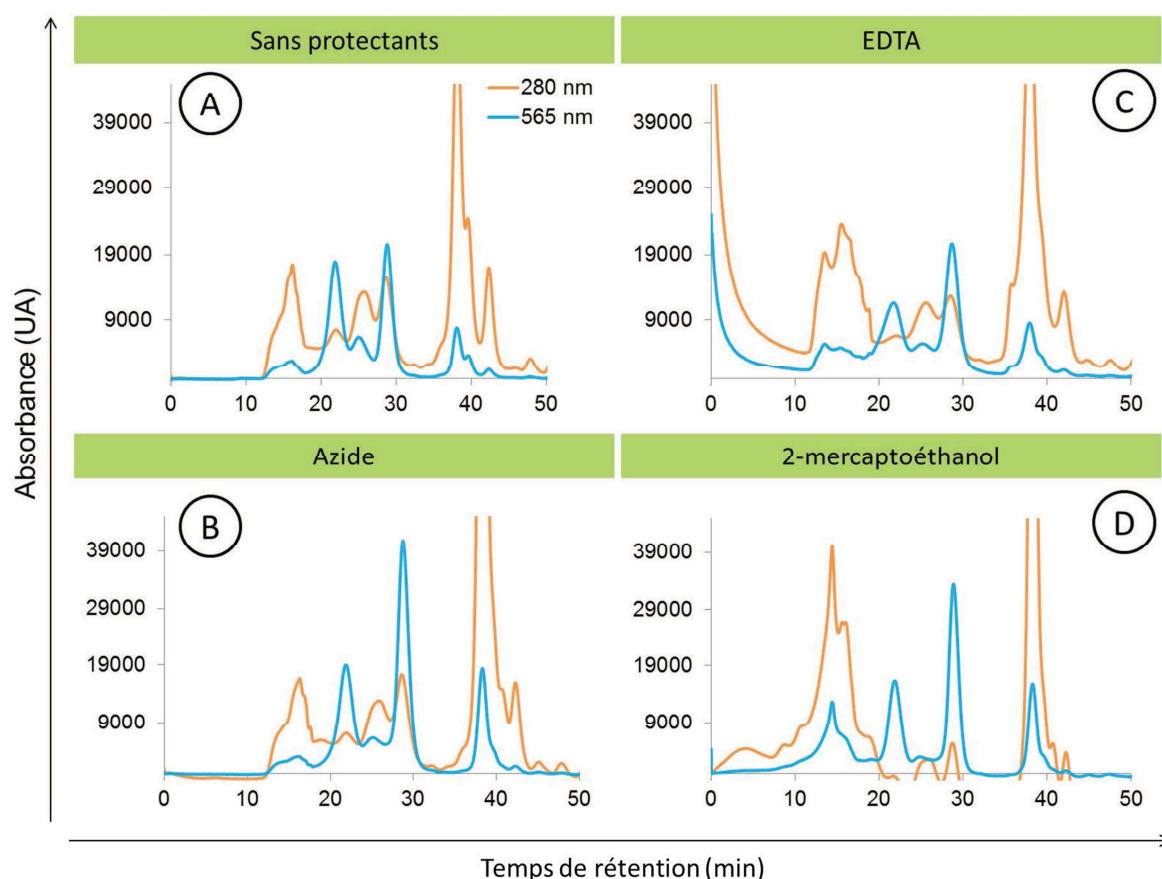
Les pics caractéristiques de la R-PE sont présents sur les quatre spectres : les protectants utilisés n'ont pas d'effet sur l'allure du spectre de la R-PE. Le rendement en R-PE et l'IP sont calculés à partir de ces spectres (Tableau XXI).

**Tableau XXI : indice de pureté et rendement en R-PE déterminés à partir des spectres d'absorbances des extraits bruts obtenus après extraction au tampon phosphate (pH 7,1 ; 20 mM) avec et sans ajout de protectants seuls**

	IP	Rendement (mg R-PE.g <sup>-1</sup> MS)
sans protectants	0,34 ± 0,00	4,87 ± 0,04
azide de sodium (4 mM)	0,33 ± 0,01	4,90 ± 0,36
2-mercaptoéthanol (5 mM)	0,31 ± 0,01	4,28 ± 0,28
EDTA (2 mM)	0,32 ± 0,00	3,95 ± 0,11

Que ce soit sur le rendement d'extraction ou l'IP, l'ajout d'azide de sodium, de 2-mercaptoéthanol ou d'EDTA, n'a pas d'effet (pas de différences significatives).

Les extraits bruts obtenus avec ou sans addition de protectants au tampon d'extraction, sont ensuite analysés par chromatographie de gel filtration (Figure 81).



**Figure 81 : chromatogrammes de gel filtration des extraits bruts obtenus par extraction au tampon phosphate seul (A) et additionné de protectant seul : (B) azide de sodium ; (C) EDTA ; (D) 2-mercaptoéthanol**

La figure A correspond au chromatogramme de l'extrait brut obtenu par extraction classique (sans addition de protectants). Les deux pics caractéristiques de la R-PE sont de même intensité ; ce qui n'est pas le cas au niveau des chromatogrammes obtenus lors de l'ajout de protectants.

L'azide de sodium (Figure 81 B) n'a pas d'effet sur la R-PE native puisque le pic est de même intensité que celui obtenu sans ajout d'azide de sodium. L'azide induit par contre une augmentation de l'intensité du pic correspondant à la forme dissociée de R-PE de 60 kDa.

L'EDTA par contre induit bien une dissociation de la forme native de la R-PE (Figure 81 C). Pour le 2-mercaptoéthanol (Figure 81 D) l'effet est intermédiaire à celui de l'azide et de l'EDTA puisqu'il provoque une légère dissociation de la R-PE native et une augmentation de l'intensité du pic correspondant à la forme dissociée.

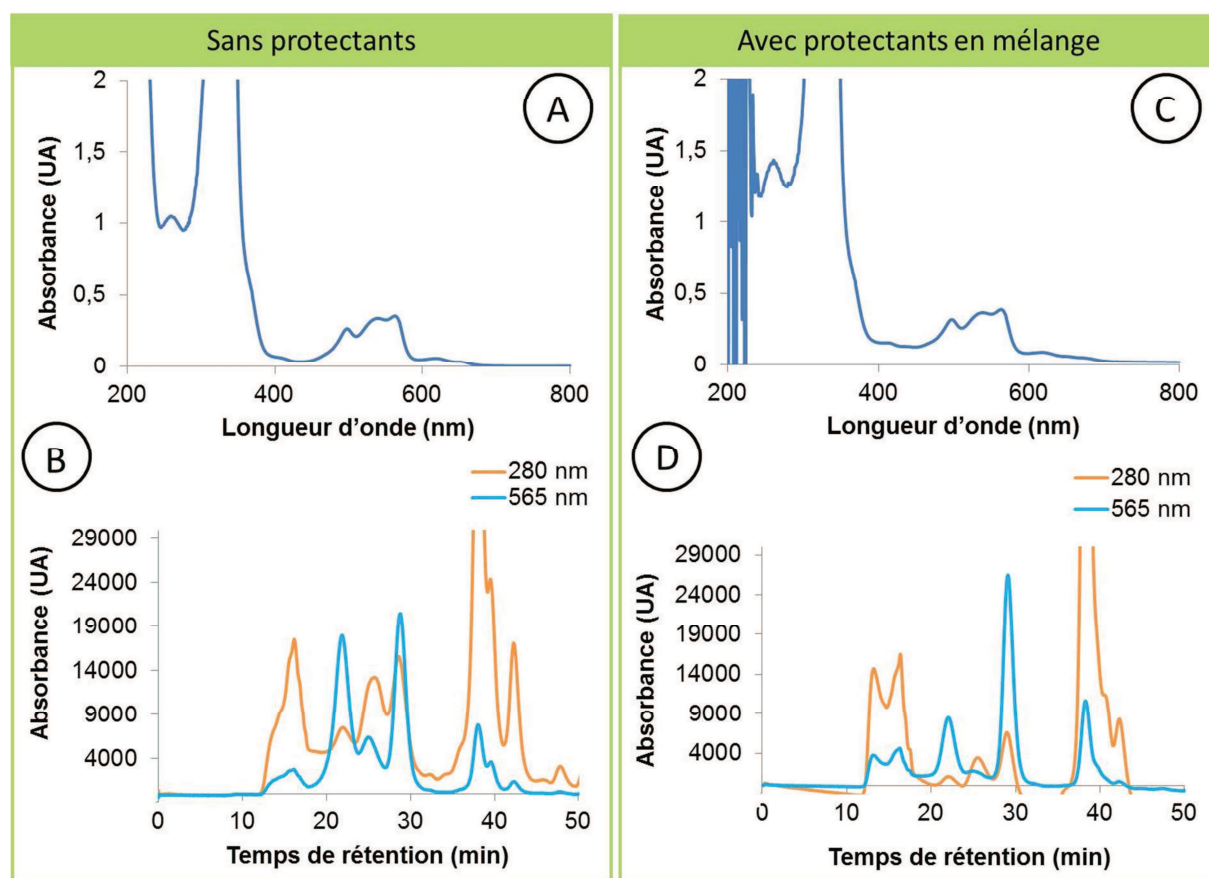
Peu d'études se sont intéressées à étudier l'effet de l'ajout de protectants au tampon d'extraction sur les phycobiliprotéines. Bien qu'il soit d'usage d'ajouter des protectants dans les protocoles de purifications, leur présence ne semble pas si pertinente vis-à-vis de la R-PE. Des résultats contradictoires ont été publiés. Une étude de 2001 a montré que le mercaptoéthanol a un effet protecteur sur la fluorescence de la R-PE (Orta-Ramirez *et al.* 2001) ; alors qu'en 1984, Guard-Friar et MacColl ont montré que le mercaptoéthanol pouvait altérer les propriétés spectrales des phycobiliprotéines.

Les protectants sont souvent utilisés en mélange pour prévenir tout risque d'altération. C'est la démarche que nous avons développée pour la suite de l'étude.

### 2.2.2. Protectants en mélange

Comme le montre la Figure 82, l'ajout des trois protectants en mélange ne modifie pas le spectre d'absorbance de la R-PE puisque les pics caractéristiques à 498, 540 et 565 nm sont présents (Figure 82 A et C). Le rendement en R-PE et l'indice de pureté ont été déterminés à partir des spectres (Tableau XXII).





**Figure 82 : spectres d'absorbance et chromatogrammes de gel filtration des extraits bruts obtenus sans protectants (A et B) et avec protectants (C et D)**

Les spectres d'absorbance des extraits bruts obtenus sans et avec protectants sont comparables (Figure 82 A et C). On observe la présence des trois pics caractéristiques de la R-PE à 498, 540 et 565 nm. Par contre, les chromatogrammes de gel filtration à 280 et 565 nm (Figure 82 B et D) montrent des différences importantes. À 280 nm, il y a une diminution importante de la fraction de masse moléculaire élevée. À 565 nm, l'intensité du pic correspondant à la R-PE native est réduite de moitié. Par conséquent, l'ajout des protectants en mélange ne permet pas d'améliorer l'extraction de la R-PE, provoquant même une dénaturation de la R-PE native.

Le rendement en R-PE est du même ordre de grandeur lorsqu'il y a ajout de protectants ou non (pas de différence significative). Par contre, la valeur de l'IP est significativement inférieure en présence de protectants ( $p < 5\%$ ).

**Tableau XXII : indice de pureté et rendement en R-PE déterminés à partir des spectres d'absorbances des extraits bruts obtenus après extraction au tampon phosphate (pH 7,1 ; 20 mM) avec et sans ajout de protectants en mélange**

	IP	Rendement (mg R-PE/g de poudre algale)
sans protectants	0,35 ± 0,02	4,05 ± 0,23
avec protectants	0,30 ± 0,01*	3,89 ± 0,25

La chromatographie de gel filtration analytique montre un effet dénaturant des protectants sur la R-PE (dominance de la forme dissociée de la R-PE) qui n'est pas observé par analyse spectrale. Car bien que l'ajout de protectant n'ai pas d'effet sur l'indice de pureté ou sur le rendement d'extraction, ni sur l'allure du spectre, l'ajout de protectants seuls ou en mélange induit une dominance de la forme dissociée de la R-PE.

Il ne semble donc pas être pertinent d'ajouter ces protectants seuls ou en mélange au tampon d'extraction au regard de l'extraction de la R-PE sous sa forme native.

### 3. Etude de l'effet de conservateurs alimentaires sur la stabilité de la R-PE extraite de *Grateloupia turuturu* dans le temps et à différentes températures de stockage

Les additifs alimentaires sont utilisés depuis des siècles par l'homme, c'est le cas du sel, du sucre et du vinaigre pour leurs propriétés de conservateurs alimentaires (Mishra *et al.* 2010). C'est ainsi que le chlorure de sodium et le saccharose ont été choisis. De plus, en 1996 Makki et Durance ont montré que le saccharose et le chlorure de sodium augmentent la stabilité du lysozyme à la température. Le saccharose diminue l'**activité de l'eau**<sup>47</sup> des produits qui en contiennent beaucoup, permettant ainsi leur conservation (Mathlouthi 2013). L'acide citrique a été choisi car selon Mishra *et al.* (2010), il s'avère être un bon stabilisant de la C-PE. De plus il possède des propriétés bactéricides et fongicides et antioxydantes (E330). Le chlorure de magnésium a été retenu du fait que le magnésium est un cation bivalent, contrairement au sodium. Le magnésium a des propriétés de rétention de la coloration et de stabilisation (E511). L'acide ascorbique, ou vitamine C, naturellement présent dans les agrumes, est utilisé comme additif alimentaire (E300) pour ses propriétés antioxydantes. De plus, dans l'étude de Sampath-Wiley *et al.* (2008), 0,7 mM d'ascorbate est ajouté au tampon d'extraction. Ainsi, l'ajout de ces conservateurs peut potentiellement augmenter la stabilité d'extraits de R-PE. C'est l'objectif de cette étude.

#### 3.1. Protocole de l'étude

Les expériences sont conduites en triplicat pour les cinq conservateurs testés : chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ), chlorure de sodium (NaCl), saccharose, acide ascorbique et acide citrique. L'extrait brut est solubilisé dans le tampon phosphate (20 mM, pH 7,1) à une concentration finale de 0,1 mg de R-PE/mL et les cinq conservateurs sont testés à une concentration de 2 mg/mL. Le suivi se fait sur 42 jours à l'obscurité et à trois températures différentes : température ambiante (TA), 4°C et -20°C. L'extrait brut sans conservateur sert de témoin. Tous les échantillons sont préparés au jour 0 pour réaliser toutes les mesures de façon à s'affranchir du phénomène de congélation/décongélation et sont stockés à l'obscurité durant toute l'étude. Chaque échantillon est analysé par spectrophotométrie d'absorbance, de fluorescence et par chromatographie de gel filtration.

---

<sup>47</sup> Principal paramètre influençant la conservation d'un aliment ou d'un produit pharmaceutique ou cosmétique. Il s'agit de la disponibilité de l'eau pour les microorganismes. Plus la quantité d'eau libre est importante et plus les micro-organismes se développeront.

### 3.2. Résultats et discussion

#### 3.2.1. Stockage à température ambiante

Les Tableaux XXIII et XXIV représentent l'évolution de l'intensité de fluorescence et de la concentration en R-PE des échantillons stockés à température ambiante ( $18,4 \pm 1,6^\circ\text{C}$ ) pendant les 42 jours de l'étude.

**Tableau XXIII : évolution de l'intensité de fluorescence des échantillons de R-PE stockés à température ambiante pendant 42 jours, par rapport au témoin au jour 0 (exprimée en %)**

	Jour 0	Jour 6	Jour 13	Jour 20	Jour 28	Jour 35	Jour 42
Témoin	100 ± 1	54 ± 6	51 ± 19	73 ± 30	57 ± 18	32 ± 1	23 ± 16
MgCl <sub>2</sub>	101 ± 1	65 ± 3	66 ± 10	68 ± 5	71 ± 6	43 ± 2*	5 ± 3
NaCl	100 ± 1	57 ± 6	68 ± 13	75 ± 5	74 ± 5	58 ± 7*	59 ± 12*
Saccharose	101 ± 0	57 ± 7	78 ± 32	60 ± 16	83 ± 4	75 ± 21*	80 ± 6*
Acide ascorbique	97 ± 1	66 ± 1	55 ± 4	69 ± 6	72 ± 7	72 ± 4*	68 ± 5*
Acide citrique	66 ± 0*	7 ± 0*	8 ± 3	6 ± 1*	3 ± 1*	3 ± 1*	4 ± 3

NB : \* résultats significativement différents avec  $p < 5\%$ .

**Tableau XXIV : évolution de la concentration en R-PE des échantillons stockés à température ambiante par rapport au témoin à J0 (exprimée en %)**

	J0	J6	J13	J20	J28	J35	J42
Témoin	100 ± 1	78 ± 6	50 ± 21	54 ± 22	44 ± 16	15 ± 11	12 ± 12
MgCl <sub>2</sub>	99 ± 0	85 ± 1	79 ± 1*	66 ± 1	55 ± 0	34 ± 1	-1 ± 3
NaCl	99 ± 0	82 ± 2	78 ± 4*	71 ± 3	60 ± 2	49 ± 4*	40 ± 10*
Saccharose	98 ± 0	84 ± 2	84 ± 0*	59 ± 19	65 ± 3	53 ± 17*	57 ± 4*
Acide ascorbique	100 ± 0	96 ± 1*	86 ± 2*	83 ± 1	65 ± 6	57 ± 3*	74 ± 8*
Acide citrique	86 ± 1*	23 ± 0*	8 ± 0*	8 ± 2*	2 ± 0*	1 ± 0	-4 ± 2

NB : \* résultats significativement différents avec  $p < 5\%$ .

L'acide citrique est le seul conservateur ayant un effet négatif et ce dès le début de l'expérience. Dès le premier jour, il induit une forte diminution de l'intensité de fluorescence (34% par rapport au témoin). Cette diminution de la fluorescence observée pour l'acide citrique s'intensifie pour atteindre dès le 6<sup>ème</sup> jour une valeur de 93% qui demeure très faible jusqu'au 42<sup>ème</sup> jour ( $4 \pm 3\%$ ) (Tableau XXIII).

En ce qui concerne les autres conservateurs, des différences significatives de fluorescence apparaissent au 35<sup>ème</sup> jour d'analyse. Que ce soit en présence de saccharose ou d'acide

ascorbique, l'intensité de fluorescence est environ 2,3 fois supérieure à celle du témoin. Ce phénomène se confirme au 42<sup>ème</sup> jour. Pour les sels ( $MgCl_2$  et NaCl), l'effet positif est moins marqué puisque les valeurs sont respectivement 1,3 et 1,8 fois supérieures au témoin et cet effet n'est confirmé que pour le NaCl au 42<sup>ème</sup> jour.

Des résultats similaires sont obtenus pour la concentration en R-PE (Tableau XXIV). En présence d'acide citrique, la concentration en R-PE n'est plus que de  $23 \pm 0$  % par rapport à celle du témoin dès le 6<sup>ème</sup> jour et diminue au cours du temps.

Des effets significativement différents du témoin sont observés pour tous les conservateurs au 13<sup>ème</sup> jour, ce qui est dû à la faible concentration du témoin à ce jour. Ces effets ne sont pas constatés par la suite.

Au 35<sup>ème</sup> jour, seuls les échantillons contenant du saccharose, de l'acide ascorbique et du NaCl présentent des différences significatives avec une concentration trois fois supérieure à celle de l'échantillon témoin. Ces trois conservateurs peuvent donc être utilisés pour améliorer significativement la conservation des extraits de R-PE à température ambiante.

Très peu d'études similaires ont été réalisées. Seule celle de Mishra *et al.* en 2010 a testé l'effet de l'acide citrique, du saccharose, du chlorure de sodium et du chlorure de calcium à 35°C sur la C-PE. Cette étude montre que seul l'acide citrique permet une conservation de la C-PE. Le tampon d'extraction utilisé dans cette étude étant à une molarité de 100 mM, le pH de la solution a pu être maintenu. Ce n'est pas le cas dans notre étude, puisqu'une chute de pH de 7,1 à 3,5 a été observée après l'ajout d'acide citrique. C'est probablement cette chute de pH qui a induit une dénaturation de la R-PE native et non l'acide citrique. C'est en fait un effet pH correspondant à celui que nous avons mis en évidence lors de l'étude de stabilité de l'extrait brut (Chapitre III).

### 3.2.2. Stockage à 4°C

Les Tableaux XXV et XXVI représentent l'évolution de l'intensité de fluorescence et de la concentration en R-PE des échantillons stockés à 4°C pendant les 42 jours de l'étude.

**Tableau XXV : évolution de l'intensité de fluorescence de la R-PE des échantillons stockés à 4°C par rapport au témoin à J0 (exprimée en %)**

	J0	J6	J20	J28	J35	J42
Témoin	100 ± 2	69 ± 11	73 ± 18	86 ± 2	84 ± 1	40 ± 13
MgCl <sub>2</sub>	99 ± 1	69 ± 5	94 ± 13	82 ± 8	78 ± 2	65 ± 3*
NaCl	99 ± 2	75 ± 2	80 ± 0	90 ± 7	87 ± 3	65 ± 2*
Saccharose	96 ± 1	79 ± 0	84 ± 5	95 ± 8	85 ± 10	77 ± 4*
Acide ascorbique	98 ± 1	50 ± 9	75 ± 5	90 ± 11	90 ± 2	67 ± 2*
Acide citrique	72 ± 0*	10 ± 1*	7 ± 0*	14 ± 6*	10 ± 6*	6 ± 0*

NB : \* résultats significativement différents avec  $p < 5\%$ .

Remarque : les données du 13<sup>ème</sup> jour n'ont pas pu être acquises pour un problème d'accessibilité aux équipements.

**Tableau XXVI : évolution de la concentration en R-PE des échantillons stockés à 4°C par rapport au témoin à J0 (exprimée en %)**

	J0	J6	J20	J28	J35	J42
Témoin	100 ± 1	86 ± 1	65 ± 18	62 ± 12	65 ± 4	21 ± 19
MgCl <sub>2</sub>	100 ± 1	87 ± 1	81 ± 4	70 ± 3	64 ± 3	58 ± 6
NaCl	100 ± 1	87 ± 1	82 ± 0	70 ± 4	63 ± 2	55 ± 2
Saccharose	101 ± 1	88 ± 1	72 ± 4	69 ± 8	79 ± 1	75 ± 0*
Acide ascorbique	104 ± 2	101 ± 1*	95 ± 0*	87 ± 2*	83 ± 4*	72 ± 2*
Acide citrique	97 ± 2	87 ± 1	15 ± 1*	10 ± 1*	7 ± 0*	3 ± 1

NB : \* résultats significativement différents avec  $p < 5\%$ .

Remarque : les données du 13<sup>ème</sup> jour n'ont pas pu être acquises pour un problème d'accessibilité aux équipements.

De même qu'à température ambiante, l'acide citrique est le seul conservateur ayant un effet négatif. Dès le premier jour de l'étude, il induit une diminution de l'intensité de fluorescence de 28%. Cette diminution de fluorescence s'intensifie pour atteindre dès le 6<sup>ème</sup> jour une valeur de 90% qui demeure très faible jusqu'au 42<sup>ème</sup> jour (Tableau XXV).

En ce qui concerne les autres conservateurs, des différences significatives de fluorescence apparaissent uniquement au 42<sup>ème</sup> jour de l'étude. L'intensité de fluorescence est 1,6 fois supérieure à celle du témoin, et ce pour le MgCl<sub>2</sub>, le NaCl, et l'acide ascorbique. Seul le saccharose permet de conserver l'intensité de fluorescence plus de deux fois supérieure à celle du témoin.

Des résultats différents sont obtenus pour la concentration en R-PE (Tableau XXVI). En effet, l'acide citrique présente un effet négatif sur la concentration en R-PE plus tardivement (20<sup>ème</sup> jour) que sur l'intensité de fluorescence. Cependant, il est fort probable que cet effet négatif aurait été constaté au 13<sup>ème</sup> jour de l'étude, si cette mesure avait été effectuée. Au 20<sup>ème</sup> jour de l'étude, il ne reste plus que  $15 \pm 1$  % de la concentration en R-PE initiale. Cette concentration demeure très faible pour atteindre seulement  $3 \pm 1$  % au dernier jour de l'étude.

Au niveau des autres conservateurs, seul l'acide ascorbique présente un effet significativement différent du témoin sur la concentration en R-PE, et ce dès le 6<sup>ème</sup> jour de l'étude. Au dernier jour de l'étude, l'acide ascorbique permet de maintenir une concentration en R-PE de plus de 3 fois supérieure à celle du témoin. Le saccharose présente également un effet significativement différent du témoin au dernier jour de l'étude, permettant également de préserver près de 3 fois plus de R-PE que l'échantillon témoin.

En comparant les valeurs des témoins des deux températures (température ambiante et 4°C), le stockage à 4°C semble augmenter la stabilité du témoin par rapport à un stockage à température ambiante. Il permet également de mettre en évidence l'effet positif de l'acide ascorbique et du saccharose sur la stabilité de la R-PE. Là encore, très peu d'études existent sur la stabilité des phycobiliprotéines à différentes températures en présence de conservateurs. Cependant, une étude a également montré l'effet stabilisateur du saccharose sur la phycocyanine de *Spirulina sp.* (Chaiklahan *et al.* 2012).

### 3.2.3. Stockage à -20°C

Les résultats obtenus après stockage à -20°C sont présentés Tableau XXVII pour la fluorescence et Tableau XXVIII pour la concentration en R-PE.

**Tableau XXVII : évolution de l'intensité de fluorescence de la R-PE des échantillons stockés à -20°C par rapport au témoin à J0 (exprimée en %)**

	J0	J6	J13	J20	J28	J35	J42
Témoin	100 ± 1	59 ± 13	57 ± 3	71 ± 6	55 ± 8	47 ± 8	44 ± 1
MgCl <sub>2</sub>	96 ± 1	55 ± 3	62 ± 7	61 ± 3	58 ± 3	53 ± 2	50 ± 4
NaCl	98 ± 3	42 ± 1	47 ± 5	46 ± 2*	46 ± 2	58 ± 11	41 ± 1
Saccharose	102 ± 1	52 ± 4	51 ± 6	64 ± 1	58 ± 6	50 ± 9	44 ± 2
Acide ascorbique	99 ± 2	60 ± 3	72 ± 1	59 ± 7	52 ± 3	52 ± 9	35 ± 2*
Acide citrique	82 ± 1*	38 ± 2	26 ± 3*	34 ± 7*	30 ± 2*	40 ± 4	19 ± 1*

NB : \* résultats significativement différents avec  $p < 5\%$ .

**Tableau XXVIII : évolution de la concentration en R-PE des échantillons stockés à -20°C par rapport au témoin à J0 (exprimée en %)**

	J0	J6	J13	J20	J28	J35	J42
Témoin	100 ± 1	91 ± 1	90 ± 1	83 ± 1	81 ± 2	81 ± 3	80 ± 2
MgCl <sub>2</sub>	100 ± 2	93 ± 1	85 ± 7	86 ± 1	83 ± 1	86 ± 2	87 ± 1*
NaCl	101 ± 2	90 ± 1	89 ± 1	80 ± 2	79 ± 1	81 ± 1	81 ± 1
Saccharose	100 ± 1	92 ± 1	90 ± 0	84 ± 1	80 ± 2	86 ± 2	84 ± 2
Acide ascorbique	103 ± 1	96 ± 1	95 ± 4	86 ± 2	90 ± 3	89 ± 1*	91 ± 2*
Acide citrique	94 ± 1*	74 ± 3*	73 ± 1*	68 ± 1*	70 ± 3*	80 ± 2	66 ± 1*

NB : \* résultats significativement différents avec  $p < 5\%$ .

Dès le premier jour de l'étude l'acide citrique présente un effet négatif sur l'intensité de fluorescence de la R-PE avec une diminution de 18% de l'intensité de fluorescence par rapport au témoin. Au 6<sup>ème</sup> jour, cet effet négatif de l'acide citrique s'intensifie puisqu'il entraîne une diminution de l'intensité de fluorescence de 62%. La fluorescence diminue très progressivement au cours de l'étude pour atteindre seulement 19 ± 1 % au dernier jour (Tableau XXVII).

Aucun des autres conservateurs utilisés dans cette étude ne présente un effet positif sur la conservation de la fluorescence. Au dernier jour de l'étude il reste entre 40 et 50% de l'intensité de fluorescence dans l'échantillon témoin, tout comme dans les échantillons de saccharose, NaCl et MgCl<sub>2</sub>. L'échantillon contenant de l'acide ascorbique présente une intensité de fluorescence significativement différente au 42<sup>ème</sup> jour de l'étude et plus faible (35 ± 2 %) que celle du témoin (44 ± 1%). Il en est de même pour le NaCl mais uniquement au 20<sup>ème</sup> jour de l'étude.

Au niveau de la concentration en R-PE (Tableau XXVIII), des résultats similaires sont obtenus pour l'acide citrique. Cependant, l'effet négatif de l'acide citrique est moins marqué à -20°C qu'à température ambiante et à 4°C. En effet, à -20°C, au 1<sup>er</sup> jour de l'étude il reste 94 ± 1 % de la concentration en R-PE dans l'échantillon contenant de l'acide citrique (significativement différent du témoin). Au 6<sup>ème</sup> jour, une diminution de 26% par rapport au témoin est constatée. Au dernier jour, il reste 66 ± 1 % de la concentration en R-PE dans l'échantillon contenant de l'acide citrique.

Pour les autres conservateurs, contrairement à l'intensité de fluorescence, l'acide ascorbique est significativement différent du témoin à partir du 35<sup>ème</sup> jour, permettant de conserver 89 ± 1 % de la concentration en R-PE. Le MgCl<sub>2</sub> présente également une



différence significative de concentration en R-PE par rapport au témoin, au dernier jour de l'étude. Il permet de conserver  $87 \pm 1$  % de la concentration en R-PE.

De manière générale, le stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$  permet, pour tous les échantillons hormis ceux contenant de l'acide citrique, de conserver entre 80 et 91% de la concentration en R-PE (Tableau XXVIII) alors qu'il induit une baisse de la fluorescence (de 40 à 58%) et ce dès le 6<sup>ème</sup> jour. L'observation inverse est faite lorsque les échantillons sont stockés à température ambiante et à  $4^{\circ}\text{C}$ .

Cette étude confirme également les résultats obtenus dans le Chapitre IV, indiquant que la température de stockage a un effet sur la stabilité de la R-PE. La température ambiante ne permet pas une conservation optimale de la R-PE. En revanche, une conservation à  $4^{\circ}\text{C}$  et  $-20^{\circ}\text{C}$  permet de maintenir la R-PE stable. Dans le Chapitre IV, il est montré que le stockage d'échantillons à  $-20^{\circ}\text{C}$  est la meilleure condition pour préserver le pigment. Cependant, seules des analyses de fluorescence et de spectrophotométrie ont été effectuées pour cette précédente étude.

L'analyse par chromatographie de gel filtration permet-elle d'apporter plus d'informations quant à l'effet des conservateurs et des températures de stockage sur la R-PE ?

#### 3.2.4. Analyse par chromatographie de gel filtration

L'extrait brut analysé en chromatographie de gel filtration (Chapitre V) est constitué de deux formes de R-PE. La R-PE native de 260 kDa d'une part et une forme dissociée de R-PE de 60 kDa.

Les échantillons de cette étude ont été analysés par chromatographie de gel filtration afin d'observer l'effet des conservateurs à trois températures différentes sur la structure de la R-PE. Ainsi, le ratio (appelé R) entre l'aire du pic de la R-PE native de 260 kDa et l'aire du pic de la R-PE dénaturée de 60 kDa a été calculé pour chaque condition. Lorsque la forme native de la R-PE prédomine alors R est supérieur à 1 et inversement lorsque la forme dissociée de la R-PE prédomine. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 83.

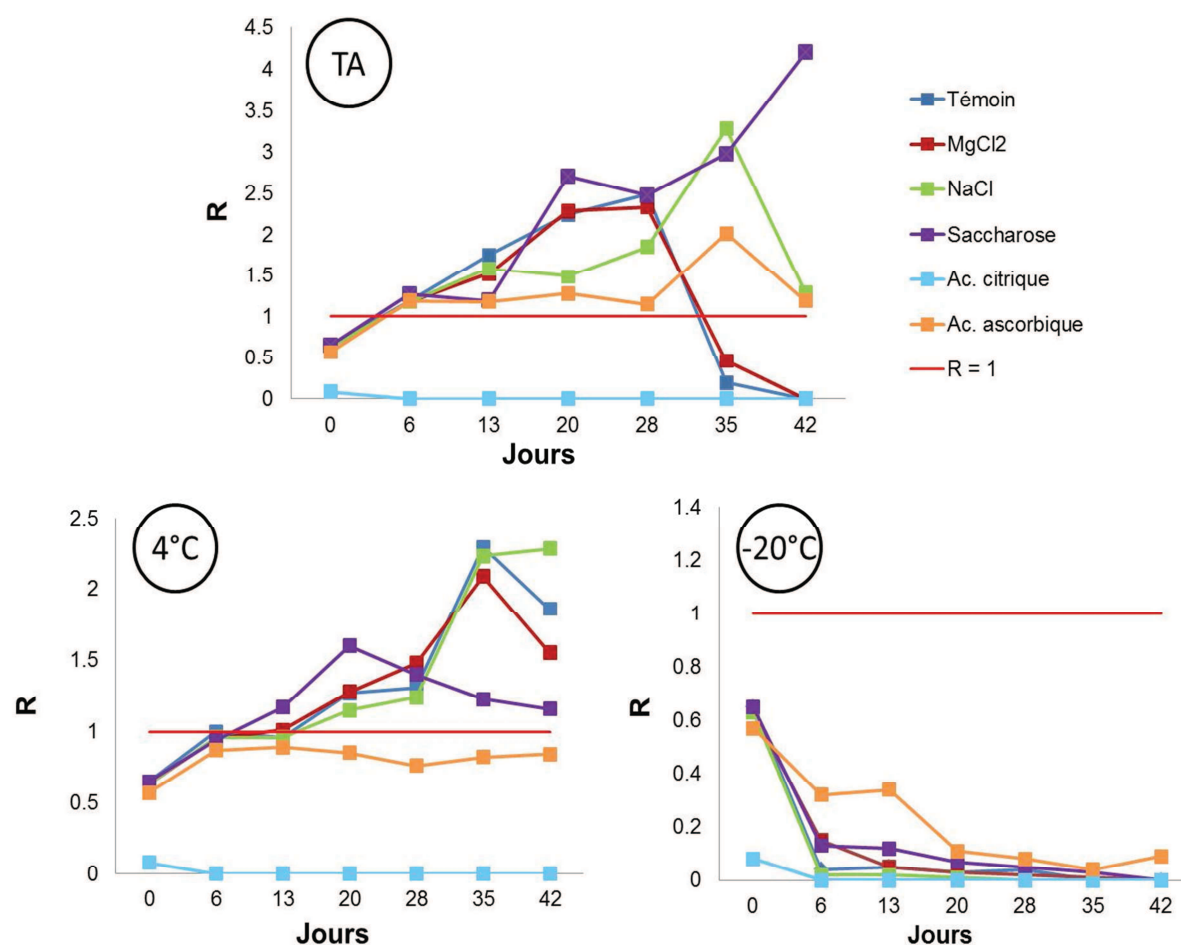


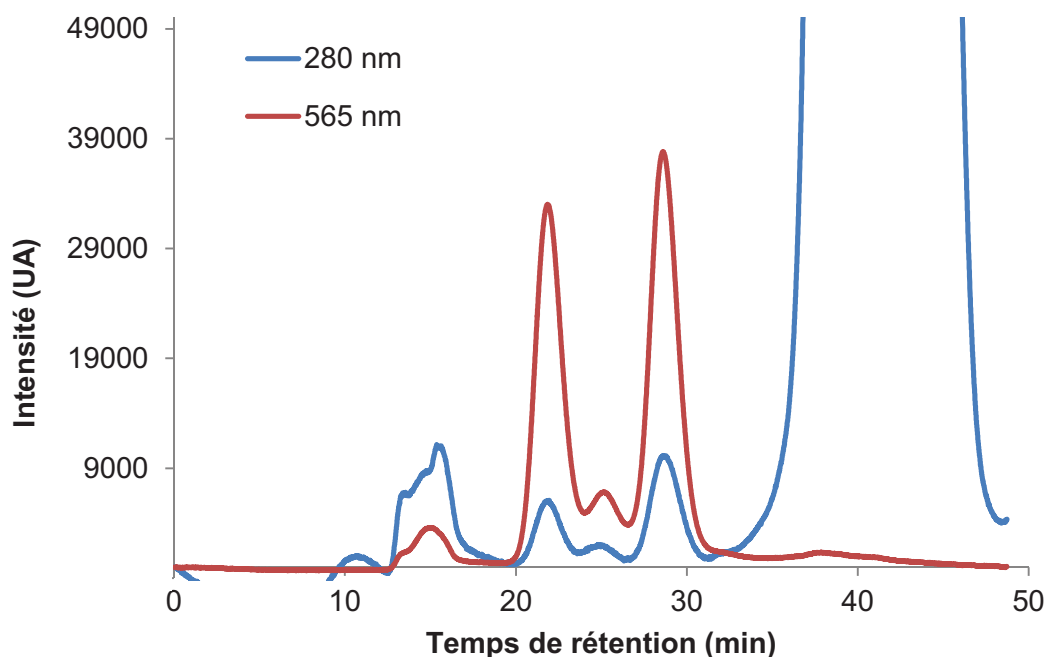
Figure 83 : évolution du ratio R pour les 5 conservateurs étudiés et le témoin au cours des 42 jours aux trois températures de stockage étudiées

Ces courbes montrent que l'acide citrique induit une chute du ratio R dès le premier jour de l'étude et ce pour les trois températures. Ces résultats confirment les observations précédentes. Ainsi, l'acide citrique induit une dénaturation de la R-PE native. Ceci est probablement dû à la chute du pH et non à l'acide citrique en tant que tel. Il serait intéressant d'étudier l'effet de l'acide citrique sur la stabilité de la R-PE extraite avec un tampon de plus grande molarité qui permettrait de maintenir le pH à une valeur voisine de 7.

Pour les autres conservateurs, à température ambiante, le saccharose se détache nettement du témoin. Il induit une augmentation du ratio R, révélant un effet positif sur la conservation de la forme native de la R-PE. Cette observation concorde avec les observations faites à température ambiante d'après la fluorimétrie et la spectrophotométrie.

L'acide ascorbique à 4°C permet de maintenir le ratio R (légèrement inférieur à 1) stable tout le long de l'étude contrairement au témoin et aux autres conservateurs. Ceci confirme les résultats obtenus précédemment.

Ce résultat est confirmé par la Figure 84, qui représente le chromatogramme d'un échantillon de R-PE, stocké à 4°C pendant 35 jours, en présence d'acide ascorbique. Tout comme dans l'échantillon témoin préparé au 1<sup>er</sup> jour, les deux formes de R-PE sont présentes. Il y a eu une légère dissociation de la R-PE puisque l'intensité du premier pic est légèrement plus faible et celle du second pic est légèrement plus intense. Le pic observé à 280 nm à 40 min correspond à l'acide ascorbique qui absorbe fortement à cette longueur d'onde.



**Figure 84 : chromatogramme de l'extrait contenant de l'acide ascorbique stocké 35 jours à 4°C**

D'après la Figure 83, on peut voir que le stockage à -20°C induit une chute du ratio à près de 0 et ce pour tous les conservateurs. La congélation induit donc une dénaturation de la forme native de la R-PE.

La Figure 85, correspond au chromatogramme de l'échantillon contenant de l'acide ascorbique, après 35 jours de stockage à -20°C. Les mêmes profils chromatographiques sont obtenus à -20°C pour l'ensemble des échantillons. Il met clairement en évidence l'effet dénaturant de la congélation sur la R-PE native par une absence totale du premier pic et une augmentation de l'intensité du second.

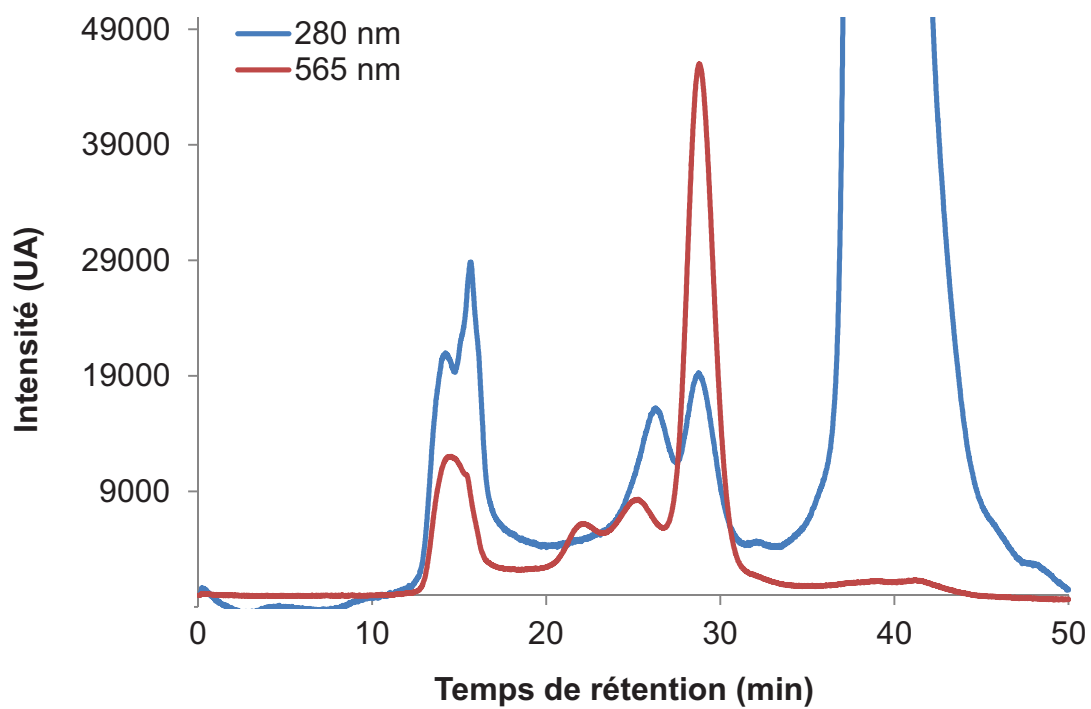


Figure 85 : chromatogramme de l'échantillon contenant de l'acide ascorbique stocké 35 jours à -20°C

### 3.2.1. Analyse colorimétrique



Figure 86 : évolution de la coloration des échantillons stockés à température ambiante, à 4°C et à -20°C, entre le premier jour et le dernier jour de l'étude. A : témoin ; B : NaCl ; C : MgCl<sub>2</sub> ; D : saccharose ; E : acide ascorbique ; F : acide citrique

Au premier jour de l'étude (J0), les échantillons sont tous de couleur rose excepté ceux contenant de l'acide citrique qui sont rose-violet (Figure 86). Ceci est dû à une chute de pH engendrée par l'acide citrique. Le tampon d'extraction utilisé dans cette étude n'est donc pas suffisamment concentré pour maintenir le pH stable. Cette chute de pH induit une dégradation de la R-PE, ce qui rend l'utilisation de ce conservateur inefficace sur la stabilisation de la R-PE dans ces conditions d'extraction.

Au dernier jour de l'étude, ce sont les échantillons stockés à température ambiante qui présentent les plus fortes dégradations de coloration. Les échantillons témoins et ceux contenant du NaCl sont de couleur rose pâle tandis que ceux contenant du MgCl<sub>2</sub>, du saccharose et de l'acide ascorbique sont de couleur rose-orangée. Ceux contenant de l'acide citrique ne sont plus du tout colorés. Pour un stockage à 4°C, seuls les échantillons contenant de l'acide citrique présentent une dégradation de la couleur (légèrement rosés) tandis que les autres échantillons sont tous de couleur rose-orangée (les plus intenses sont le saccharose et l'acide ascorbique). La meilleure condition de préservation de la coloration est un stockage des extraits à -20°C puisqu'au dernier jour de l'étude, tous les échantillons présentent les mêmes couleurs que lorsqu'ils ont été préparés au premier jour de l'étude (Figure 86).

#### 4. Conclusion

Au niveau des conservateurs utilisés dans cette étude, l'acide citrique n'est pas à considérer puisqu'il a un effet négatif sur la stabilité de la R-PE et quelle que soit la température de stockage considérée. Cet effet négatif est probablement dû à l'effet pH et non à l'acide citrique en lui-même. Dans un but de stabilisation du pigment pour une utilisation en recherche, il serait intéressant de réaliser à nouveau l'étude en utilisant un tampon phosphate à 100 mM afin de maintenir le pH à 7. Cependant, dans un but d'application industrielle du pigment, pour des raisons économiques, l'extraction est réalisée à l'eau et non au tampon, conditions dans lesquelles l'ajout d'acide citrique entraînera également une chute de pH ce qui a pour conséquence d'intensifier la dénaturation de la R-PE. Dans un objectif de valorisation industrielle de ce pigment en tant que colorant agroalimentaire, l'acide citrique est donc un conservateur à exclure.

La chromatographie de gel filtration analytique réalisée dans cette présente étude a permis d'apporter des informations supplémentaires sur l'effet de la température de stockage sur la R-PE. Dans un objectif de recherche fondamentale, d'étude de la R-PE sous sa forme native, la conservation à -20°C est à proscrire car elle induit une dénaturation de cette forme. Il est donc indispensable de stocker ces échantillons à 4°C. Il faudra alors trouver les

conservateurs et/ou protectants à ajouter afin de s'affranchir des contaminations bactériennes et de maintenir la R-PE sous sa forme native stable dans le temps.

L'acide ascorbique permet de stabiliser efficacement la R-PE à 4°C et permet le maintien de la forme native de la R-PE et donc de ses propriétés. Il pourrait être intéressant de poursuivre des études de stabilité de la R-PE sous forme native à 4°C en présence de l'acide ascorbique à différentes concentrations. Une étude a montré que l'acide isoascorbique stabilise la phycocyanine (Niir Board 2006). Le saccharose quant à lui, présente un effet stabilisateur à température ambiante et également à 4°C. Il pourrait être intéressant d'effectuer d'autres études, notamment en testant l'effet concentration du saccharose sur la stabilité de la R-PE comme dans l'étude de Chaiklahan *et al.* en 2012 sur la stabilité de la phycocyanine de *Spirulina sp.*. Il pourrait être envisagé d'étudier la stabilité de la R-PE en présence d'autres sucres (glucose par exemple) et d'étudier sa stabilité dans des produits de confiserie (Dufossé *et al.* 2005).

Il pourrait être également envisagé d'étudier l'impact d'autres conservateurs. En effet, pour une application alimentaire, il a été montré que la gélatine permet de stabiliser la phycocyanine (Niir Board 2006). Pour une application cosmétique, il existe toute une gamme de conservateurs antimicrobiens, tels que l'acide sorbique, l'acide benzoïque, l'acide salicylique ou encore le glutaraldéhyde (Hernandez et Mercier-Fresnel 2006).

Dans un objectif d'application de la R-PE comme colorant en agroalimentaire, il est préférable de stocker les échantillons à -20°C puisque cette condition permet de maintenir la coloration des échantillons stable dans le temps. Cela permet également de s'affranchir des contaminations bactériennes. L'intérêt est que la forme dénaturée de la R-PE présente les mêmes propriétés que la R-PE native mais est de taille plus faible, permettant une formulation plus aisée. Il serait intéressant d'effectuer des tests de stabilité du pigment intégré dans un produit alimentaire fini, par exemple dans une glace. Il pourrait être envisagé de créer une glace à l'eau de couleur rose et fluorescente (Dufossé *et al.* 2005; Sekar et Chandramohan 2008).



## Conclusion générale

L'objectif principal de ce travail de thèse était la mise au point d'un protocole de purification de la R-phycoérythrine de l'algue rouge *Grateloupia turuturu*, et la caractérisation biochimique de ce pigment en vue d'étudier son polymorphisme.

L'algue rouge *Grateloupia turuturu*, anciennement appelée *Grateloupia doryphora*, est une algue présente sur la façade Atlantique Européenne. Elle constitue une biomasse disponible non valorisée à ce jour en France alors qu'elle a une teneur importante en R-PE, pigment protéique hydrosoluble à haute valeur ajoutée (environ 300 €/mg) et à haut potentiel d'application comme colorant alimentaire et cosmétique et comme marqueur de fluorescence.

Une étude précédente a montré que *Grateloupia turuturu* présente des variations saisonnières tant au niveau morphologique qu'au niveau biochimique. Ainsi pour valoriser l'algue comme légume de mer, cette étude a permis de mettre en évidence qu'il est préférable de la récolter au printemps et en été. Par contre, s'il s'agit de valoriser l'algue au travers du pigment, la R-phycoérythrine, il est préférable de la prélever à la fin de l'hiver.

Ce présent travail, qui fait suite à cette étude, a permis d'approfondir les connaissances sur ce modèle d'étude. En effet, des variations morphologiques et biochimiques de l'algue ont été constatées entre deux sites d'études situés sur le même niveau du littoral. Les premières observations faites en 2010, ont permis de constater des différences au niveau des facteurs abiotiques entre ces deux zones. Aucune étude environnementale n'avait été réalisée à cette époque et il est apparu indispensable de compléter ces résultats. Ainsi en 2013, les mêmes observations que celles faites en 2010 ont été obtenues, confirmant l'effet du site de prélèvement sur la morphologie et la biochimie de l'algue. De plus, les diverses variables ont été mesurées et comparées entre les deux sites. La compétition interspécifique, la bathymétrie et l'hydrodynamisme sont les facteurs pour lesquels des différences sont observées entre les deux sites. Cette étude de 2013, constitue une étude préliminaire qui a permis de définir plus précisément une stratégie d'échantillonnage. Ces résultats permettent de mettre en évidence que l'environnement dans lequel se développe l'algue, a une influence sur la composition biochimique.

*Grateloupia turuturu* est une algue proliférante ; elle possède donc des capacités d'adaptation lui permettant de se développer dans différents environnements. Le Chapitre III montre bien que sa composition biochimique varie selon les variables constituant cet environnement. Cette étude est originale du fait qu'elle s'articule sur trois niveaux : environnement – biologie – biochimie. Il serait intéressant d'approfondir les relations entre ces trois plans en étudiant plus profondément la structure de la R-PE. La R-PE est-elle au centre de cette adaptabilité que possède *Grateloupia* ?



Pour une valorisation industrielle de l'algue, au travers de l'extraction et de la purification d'un composé d'intérêt, il est indispensable de connaître ces paramètres et d'en tenir compte afin d'optimiser cette valorisation. Plusieurs possibilités existent :

- Définir et connaître l'effet des variables environnementales sur la composition biochimique de l'algue afin d'orienter le choix du site de prélèvement en fonction du composé à valoriser ;
- Prélever la biomasse algale dans diverses conditions environnementales et homogénéiser cette biomasse afin de minimiser les variations intersites ;
- Cultiver le modèle d'étude afin de produire une biomasse standardisée ;

Une fois que ces étapes situées en amont de l'extraction sont connues et maîtrisées, l'étape de purification peut être envisagée.

À ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur la purification de la R-PE à partir de *Grateloupia turuturu* présente sur les côtes françaises. Ainsi, le présent travail a permis de mettre au point un protocole de purification en une étape par chromatographie d'échange d'anions. Ce protocole permet l'obtention d'un pigment protéique concentré et partiellement purifié. L'intérêt de ce protocole, contrairement aux procédures classiques, est multiple. Il est rapide car ne fait intervenir qu'une étape et par conséquent moins coûteux que les procédures habituelles. De plus, cette étude a permis de répondre à la problématique posée : étude du polymorphisme pigmentaire de *Grateloupia turuturu*. En effet, ce protocole a permis de déterminer la masse de la R-PE à 260 kDa ce qui est plus élevé que pour d'autres espèces d'algues rouges (240 kDa pour *Palmaria palmata*). Il semble alors exister un polymorphisme pigmentaire inter-espèce. De plus, cette étude a permis d'identifier la présence d'une forme de R-PE de masse plus faible que la R-PE native. Il peut être fait l'hypothèse que cette forme correspond à une dissociation de la R-PE native. Il serait intéressant de poursuivre de manière plus approfondie, l'étude de cette forme de R-PE (spectrométrie de masse, RMN) afin de comprendre le lien entre cette forme dissociée et 60 kDa et la forme native de la R-PE. Il pourrait alors exister un polymorphisme pigmentaire au sein de *Grateloupia turuturu*.

Cette forme de R-PE n'est pas inintéressante à valoriser, au contraire, puisqu'elle présente des propriétés d'absorbance et de fluorescence légèrement différentes de la R-PE native. En effet la longueur d'onde permettant le maximum d'absorbance n'est plus à 565 nm mais à 545 nm et la longueur d'onde permettant le maximum de fluorescence n'est plus à 575 nm mais à 570 nm. Le principal avantage est qu'elle présente les mêmes propriétés de coloration que la R-PE native. De plus, sa faible masse moléculaire lui confère un atout majeur car cela permet une formulation plus simple et plus stable dans les produits alimentaires ou cosmétiques. Les étapes situées en aval de la purification sont indispensables. En effet, afin d'utiliser la R-PE de *Grateloupia turuturu* (et plus largement les phycobiliprotéines) en tant que colorant dans des

formulations alimentaire ou cosmétique, il est nécessaire d'étudier sa stabilité aux différents paramètres physico-chimiques (pH, lumière, température) mais aussi dans le temps.

Ainsi, une autre partie du présent travail a consisté à étudier l'impact de la température, du pH, de la lumière et de la durée de stockage à -20°C et à 4°C sur la stabilité du pigment. Cette étude a également été réalisée sur une autre phycoérythrine, la B-PE de *Porphyridium cruentum*, afin de comparer les deux phycoérythrines aux propriétés spectrales différentes. Il s'avère que la R-PE de *Grateloupia turuturu* est stable jusqu'à une température de 40°C, dans une gamme de pH de 4 à 10, jusqu'à 8 heures sous exposition à la lumière et dénaturée au-delà de 48 heures lorsqu'elle est conservée à 4°C alors que ses propriétés d'absorbance sont conservées au bout de deux semaines de stockage à -20°C. Les mêmes résultats ont été obtenus pour la B-PE. Ces tests ont été réalisés au niveau de l'extrait brut, il serait intéressant de réaliser les mêmes tests sur la R-PE purifiée mais également sur la R-PE intégrée dans une formulation alimentaire ou cosmétique pour observer les effets des paramètres physico-chimiques sur sa stabilité dans ces conditions.

Ainsi la R-PE présente une bonne stabilité à la température, au pH et si elle est conservée à l'obscurité. Par contre elle est rapidement dégradée au fil des jours. Ainsi un autre volet de ce présent travail a consisté à tester l'effet de protectants sur l'extraction de la R-PE puis de conservateurs alimentaires sur la stabilité de la R-PE dans le temps (sur 42 jours). Les résultats obtenus indiquent que les protectants, EDTA, azide de sodium et 2-mercaptoéthanol, dans les concentrations utilisées dans l'étude, ont un effet négatif sur l'extraction de la R-PE en induisant une dissociation de celle-ci. Dans cette étude, l'ajout de protectants au tampon d'extraction ne semble pas pertinent vis-à-vis de l'extraction de la R-PE de *Grateloupia turuturu*.

En ce qui concerne les conservateurs alimentaires, les résultats obtenus ont permis de démontrer les limites d'utilisation de l'acide citrique. Dans un objectif de valorisation industrielle de ce pigment en tant que colorant alimentaire, l'acide citrique est un conservateur à exclure. Par contre, l'acide ascorbique et le saccharose sont des conservateurs efficaces au regard du maintien de la stabilité de la R-PE. Ils permettent le maintien de la R-PE sous sa forme native à 4°C, et donc de ses propriétés de coloration, d'absorbance et de fluorescence. Ils se dégagent nettement des autres conservateurs et semblent être les plus adaptés pour la conservation d'extraits de R-PE stockés à 4°C. Cette étude a également permis de compléter la précédente en confirmant l'effet de dissociation de la R-PE native, induit par la congélation. Ceci n'avait pas pu être mis en évidence au travers des analyses spectrales et de fluorescence. Ainsi, selon l'utilisation faite de la R-PE, il est indispensable d'adapter les conditions de préservations de ce pigment.

Cette étude a permis d'approfondir les connaissances sur *Grateloupia turuturu* et plus particulièrement au niveau de son pigment, la R-PE.

Sur le plan fondamental, il a pu être mis en évidence que la R-PE de *Grateloupia turuturu* semble être différente de celle d'autres espèces d'algues rouges par sa taille et donc par sa structure. Cette différence structurale est peut-être à l'origine des capacités d'adaptations qu'elle possède et qui lui confère cette propriété proliférante contrairement aux autres espèces.

La production de phycoérythrine à partir de cette ressource pour une application comme marqueur de fluorescence est une voie de valorisation intéressante. Cette étude fournit un protocole de purification rapide et peu coûteux, ce qui s'avère intéressant à un niveau de production industrielle. Il serait intéressant d'étudier la faisabilité d'un tel protocole à l'échelle industrielle et de réaliser une étude des coûts de production engendré par un tel protocole.

Pour une utilisation comme colorant alimentaire et cosmétique, les seuils de stabilité du pigment dans un extrait brut ont été définis. Il serait intéressant de réaliser des études physicochimiques du pigment intégré à un aliment afin d'étudier sa stabilité dans le temps et aux conditions de formulation.

Une autre voie de valorisation de *Grateloupia turuturu* est l'alimentation humaine. En effet, sa teneur élevée en protéines (22% MS), et en fibres alimentaires (12,3% MS) confèrent à *Grateloupia turuturu* un intérêt nutritionnel comparable aux algues rouges déjà autorisées en alimentation humaine en France (*Palmaria palmata*). Pour qu'une algue soit autorisée à la consommation en France, il est nécessaire d'obtenir une habilitation. Pour cela, l'algue doit répondre à des critères toxicologiques fixés par le CSHPF en ce qui concerne les métaux lourds et à des critères microbiologiques (Fleurence 1991). Il est donc indispensable de réaliser ces études sur *Grateloupia turuturu*, ainsi que des études de toxicité orale afin de s'assurer qu'elle répond bien aux limites fixées par la réglementation française.

Une autre possibilité de valorisation de cette espèce réside dans sa richesse en MAAs, constituant alors une source de filtre UV d'intérêt pour l'élaboration de crèmes solaires et comme additifs alimentaires et cosmétiques pour leurs propriétés antioxydantes. Le protocole de purification mis au point dans cette étude permet également de répondre à cette voie de valorisation car en plus d'aboutir à la purification de la R-PE, il permet également d'extraire et de purifier les MAAs.

*Grateloupia turuturu* constitue une biomasse d'intérêt riche en voies de valorisation suscitant l'élaboration de nombreuses études futures.

## Références bibliographiques

### A

- Adams N.L. et Shick J.M. (1996). "Mycosporine-like amino acids provide protection against ultraviolet radiation in eggs of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*." Photochemistry and Photobiology **64**(1): 149-158.
- Adams N.L. et Shick J.M. (2001). "Mycosporine-like amino acids prevent UVB-induced abnormalities during early development of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*." Marine Biology **138**(2): 267-280.
- Algarra P., Thomas J.C. et Mousseau A. (1990). "Phycobilisome heterogeneity in the red alga *Porphyra umbilicalis*." Plant Physiology **92**(3): 570-576.
- Ambrosini E., Arnaud P. et Sebillotte-Arnaud L. (1998). "Emulsion huile-dans-eau moussante à base de tensio-actifs non-ioniques, d'une phase grasse et d'un polymère cationique ou anionique réticulé et utilisation en application topique". *L'oréal EP 0739619 B1*.
- Amersham Biosciences (2013). "Superdex 75 HR 10/30, Superdex 200 HR 10/30 Data File." Date d'accès: 08 Octobre 2013, depuis: [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314729545976/litdoc18103411AB\\_20110830220703.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314729545976/litdoc18103411AB_20110830220703.pdf).
- Apt K.E., Collier J.L. et Grossman A.R. (1995). "Evolution of the phycobiliproteins." Journal of Molecular Biology **248**(1): 79-96.
- Araoz R., Lebert M. et Hader D.P. (1998). "Electrophoretic applications of phycobiliproteins." Electrophoresis **19**: 215-219.
- Araújo R., Violante J., Pereira R., Abreu H., Arenas F. et Sousa-Pinto I. (2011). "Distribution and population dynamics of the introduced seaweed *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) along the Portuguese coast." Phycologia **50**(4): 392-402.

### B

- Baeza P. et Matsuhiro B. (1977). "Polysaccharides from chilean seaweeds IV. A sulphated galactan from *Grateloupia lanceola*." Botanica Marina **20**(6): 355.
- Bald D., Kruij J. et Rögner M. (1996). "Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: How is the phycobilisome connected with the photosystems?" Photosynthesis Research **49**(2): 103-118.
- Bandaranayake W.M. (1998). "Mycosporines. Are they nature's sunscreens?" Natural Product Reports **15**: 159-172.
- Bao D.Q., Mori T.A., Burke V., Puddey I.B. et Beilin L.J. (1998). "Effects of dietary fish and weight reduction on ambulatory blood pressure in overweight hypertensives." Hypertension **32**(4): 710-717.
- Barahona L.F. et Rorrer G.L. (2003). "Isolation of halogenated monoterpenes from bioreactor-cultured microplantlets of the macrophytic red algae *Ochtodes secundiramea* and *Portieria hornemannii*." Journal of Natural Products **66**(6): 743-751.

- Barbara I. et Cremades J. (2004). "*Grateloupia lanceola* versus *Grateloupia turuturu* (Gigartinales, Rhodophyta) en la Península Ibérica." Anales del Jardín Botánico de Madrid **61**(2): 103-118.
- Barillé-Boyer A.-L., Gruet Y., Barillé L. et Harin N. (2004). "Temporal changes in community structure of tide pools following the "Erika" oil spill." Aquatic Living Resources **17**: 323-328.
- Barreiro R., Quintela M., Barbara I. et Cremades J. (2006). "RAPD differentiation of *Grateloupia lanceola* and the invasive *Grateloupia turuturu* (Gigartinales, Rhodophyta) in the Iberian Peninsula." Phycologia **45**(2): 213-217.
- Bateman A.S. et Kelly S.D. (2007). "Fertilizer nitrogen isotope signatures." Isotopes in Environmental and Health Studies **43**(3): 237-247.
- Batista A., Raymundo A., Sousa I., Empis J. et Franco J. (2006). "Colored food emulsions - Implications of pigment addition on the rheological behavior and microstructure." Food Biophysics **1**(4): 216-227.
- Becker E.W. (1994). "Microalgae: Biotechnology and Microbiology." Cambridge University Press. 293 pp.
- Beer S. et Eshel A. (1985). "Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae." Australian Journal of Marine & Freshwater Research **36**: 785-792.
- Bei H., Guang-Ce W., Chen-Kui Z. et Zhen-Gang L. (2002). "The experimental research of R-phycoerythrin subunits on cancer treatment: A new photosensitizer in PDT." Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals **17**: 35-42.
- Bender J.C.M.E. et Pellikaan H.C. (2011). "Sterile alginate-based aqueous composition for medical use and process for the preparation thereof". WO2011112082 A1.
- Bermejo R., Talavera E.M. et Alvarez-Pez J.M. (2001). "Chromatographic purification and characterization of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* semipreparative high-performance liquid chromatographic separation and characterization of its subunits." Journal of Chromatography A **917**: 135-145.
- Bermejo R., Alvarez-Pez J.M., Acién F.G. et Molina E. (2002). "Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*." Journal of Biotechnology **93**: 73-85.
- Bhakuni D.S. et Rawat D.D.S. (2005). "Bioactive marine natural products." Springer London, Limited. 396 pp.
- Bixler H.J., Johndro K. et Falshaw R. (2001). "Kappa-2 carrageenan: Structure and performance of commercial extracts II. Performance in two simulated dairy applications." Food Hydrocolloids **15**(4-6): 619-630.
- Bligh E.G. et Dyer W.J. (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." Canadian Journal of Biochemistry and Physiology **37**(8): 911-917.
- Blinks L.R. (1964). "Accessory pigments and photosynthesis." Photophysiology **1**: 199-221.
- Bobin-Dubigeon C. (1996). "Caractérisation chimique, physico-chimique et fermentaire de produits alimentaires à base d'algues." Docteur en Sciences Biologiques fondamentales et appliquées. INRA, Université de Nantes: 196 pp.
- Bogorad L. (1975). "Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation." Annual Review of Plant Physiology **26**: 369-401.
- Boinet A. Fondateur et Directeur général de Solidarités International (2013). "Les maladies liées à l'eau non potable, première cause de mortalité au monde." Jol Press. Date

d'accès: 16 Juillet 2013, depuis: <http://www.iolpress.com/journee-eau-maladies-acces-potable-article-818292.html>.

- Borowitzka M. (1997). "Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints." Journal of Applied Phycology **9**(5): 393-401.
- Boullard B. (1997). "Le dictionnaire des Plantes et des Champignons." Éditions Estem. 875 pp.
- Bradford M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1-2): 248-254.
- Breizh'alg (2012). "Etude de marché et d'opportunité économique relative au secteur de l'algue alimentaire en France, en Europe et à l'international." Bretagne Développement Innovation. Date d'accès: 17 Juillet 2013, depuis: [http://www.bdi.fr/sites/bdi.yellowcake.net/files/ressource/etude\\_de\\_marche\\_document\\_de\\_synthese\\_vff.pdf](http://www.bdi.fr/sites/bdi.yellowcake.net/files/ressource/etude_de_marche_document_de_synthese_vff.pdf).
- Brown S.B., Holroyd J.A. et Vernon D.I. (1984). "Biosynthesis of phycobiliproteins. Incorporation of biliverdin into phycocyanin of the red alga *Cyanidium caldarium*." Biochemical Journal **219**(3): 905-909.
- Bryant D., Glazer A. et Eiserling F. (1976). "Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp." Archives of Microbiology **110**(1): 61-75.
- Bryant D.A., Hixson C.S. et Glazer A.N. (1978). "Structural studies on phycobiliproteins III. Comparison of bilin-containing peptides from the beta subunits of C-phycocyanin, R-phycocyanin, and phycoerythrocyanin." Journal of Biological Chemistry **253**(1): 220-225.
- Bryant D.A. (1982). "Phycoerythrocyanin and Phycoerythrin: properties and occurrence in Cyanobacteria." Journal of General Microbiology **128**(4): 835-844.

## C

- Cabioc'h J., Castric-Fey A., L'Hardy-Halos M.-T. et Rio A. (1997). "*Grateloupia doryphora* et *Grateloupia filicina* var. *luxurians* (Rhodophyta, Halymeniaceae) sur les côtes de Bretagne (France)." Cryptogamie: Algologie **18**(2): 117-137.
- Cabioc'h J., Floc'h J.Y., Toquin A.L., Boudouresque C.F., Meinesz A. et Verlaque M. (2006). "Guide des algues des mers d'Europe." Delachaux et Niestlé. 272 pp.
- Cardozo K.H.M., Marques L.G., Carvalho V.M., Carignan M.O., Pinto E., Marinho-Soriano E. et Colepicolo P. (2011). "Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast." Revista Brasileira de Farmacognosia **21**: 202-208.
- Carreto J.I. et Carignan M.O. (2011). "Mycosporine-Like Amino Acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects." Marine Drugs **9**(3): 387-446.
- Castlehouse H., Smith C., Raab A., Deacon C., Meharg A.A. et Feldmann J. (2003). "Biotransformation and accumulation of arsenic in soil amended with seaweed." Environmental Science and Technology **37**(5): 951-957.
- CEVA (2012). "Réglementation des algues. France." Date d'accès: 06 Juin 2013, depuis: <http://www.ceva.fr/fre/Media/Files/Ceva-Synthese-Regle-2012>.
- Chaiklahan R., Chirasuwan N. et Bunnag B. (2012). "Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives." Process Biochemistry **47**(4): 659-664.



- Chang W.-R., Jiang T., Wan Z.-L., Zhang J.-P., Yang Z.-X. et Liang D.-C. (1996). "Crystal Structure of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* 2.8 Å Resolution." Journal of Molecular Biology **262**(5): 721-722.
- Chattopadhyay K., Mateu C.G., Mandal P., Pujol C.A., Damonte E.B. et Bimalendu R. (2007). "Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: Isolation, structural features and antiviral activity." Phytochemistry **68**: 1428-1435.
- Chattopadhyay P., Chatterjee S. et Sen S.K. (2008). "Biotechnological potential of natural food grade biocolorants." African Journal of Biotechnology **7**(17): 2972-2985.
- Cho J.Y., Jin H.-J., Lim H.J. et Hong Y.-K. (1998). "Growth activation of the microalga *Isochrysis galbana* by the aqueous extract of the seaweed *Monostroma nitidum*." Journal of Applied Phycology **10**(6): 561-567.
- Cho M., Han J.H. et You S. (2011). "Inhibitory effects of fucan sulfates on enzymatic hydrolysis of starch." LWT - Food Science and Technology **44**(4): 1164-1171.
- Chojnacka K. (2011). "Using the biomass of seaweeds in the production of components of feed and fertilizers". Handbook of marine macroalgae: biotechnology and applied phycology. S.-K. Kim, John Wiley & Sons Ltd. **31**: 478-490.
- Chuner C., Chunxia L., Shuxian W., Qing W., Ziye G. et Peimin H. (2012). "Large scale preparation of phycobiliproteins from *Porphyra yezoensis* using co-precipitation with ammonium sulfate." Natural Science **4**(8): 536-543.
- Cian R.E., Salgado P.R., Drago S.R., González R.J. et Mauri A.N. (2014). "Development of naturally activated edible films with antioxidant properties prepared from red seaweed *Porphyra columbina* biopolymers." Food Chemistry **146**(0): 6-14.
- Claire C. (1992). "De la création d'une banque de données sur la composition biochimique des algues aux résultats d'une investigation systématique: Un colorant naturel stable issu d'une Rhodophycée." Docteur en Pharmacie Industrielle et Cosmétologie. Université de Nantes, Faculté des Sciences et des Techniques: 259 pp.
- Craigie J. (2011). "Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture." Journal of Applied Phycology **23**(3): 371-393.
- Craigie J.S. (1990). "Cell Walls". The biology of the Red Algae. K. M. Cole et R. G. Sheath. New York, Cambridge University: 221-257.
- Cruz-Suarez L.E., Tapia-Salazar M., Nieto-Lopez M.G., Guajardo-Barbosa C. et Ricque-Marie D. (2009). "Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds." Aquaculture Nutrition **15**(4): 421-430.

## D

- D'Agnolo E., Murano E., Rizzo R. et Paoletti S. (1993). "A biliprotein from the red alga *Gracilaria longa*: thermal stability of R-phycoerythrin." Italian Journal of Biochemistry **42**: 316-318.
- D'Agnolo E., Rizzo R., Paoletti S. et Murano E. (1994). "R-Phycoerythrin from the red alga *Gracilaria longa*." Phytochemistry **35**(3): p 693-696.
- D'Archino R., Nelson W.A. et Zuccarello G.C. (2007). "Invasive marine red alga introduced to New Zealand waters: first record of *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta)." New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research **41**: 35-42.



- de la Coba F., Aguilera J. et Figueroa F.L. (2007). "Use of mycosporin-type amino acid (shinorine) as an antioxidant". *WIPO Patent Application WO/2007/026038*.
- De Masi F. et Gargiulo G.M. (1982). ""*Grateloupia doryphora*" (Mont.) Howe (Rhodophyta, Cryptonemiales) en Méditerranée." *Allionia* **25**: 105-108.
- De Reviere B. (2003a). "Biologie et phylogénie des algues. Tome 1." Belin. 352 pp.
- De Reviere B. (2003b). "Biologie et phylogénie des algues. Tome 2." Belin. 256 pp.
- De Rosa S., Brenchley J. et Roederer M. (2003). "Beyond six colours: A new era in flow cytometry." *Nature Medicine* **9**: 112-117.
- Demetropoulos C. et Langdon C. (2004). "Pacific dulse (*Palmaria mollis*) as a food and biofilter in recirculated, land-based abalone culture systems." *Aquacultural Engineering* **32**(1): 57-75.
- Denis C. (2009). "Caractérisation biochimique de l'algue *Grateloupia turuturu*, évaluation de ses potentialités de valorisation via un procédé de digestion enzymatique et la purification partielle d'un pigment d'intérêt (R-phycoérythrine)." Docteur en Biotechnologie Marine. Université de Nantes: 153 pp.
- Denis C., Le Jeune H., Gaudin P. et Fleurence J. (2009a). "An evaluation of methods for quantifying the enzymatic degradation of red seaweed *Grateloupia turuturu*." *Journal of Applied Phycology* **21**: 153-159.
- Denis C., Ledorze C., Jaouen P. et Fleurence J. (2009b). "Comparison of different procedures for the extraction and partial purification of R-phycoerythrin from the red macroalgae *Grateloupia turuturu*." *Botanica Marina* **52**: 278-281.
- Denis C., Moranchais M., Li M., Deniaud E., Gaudin P., Wielgosz-Colin G., Barnathan G. et Fleurence J. (2010). "Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France)." *Food Chemistry* **119**: 913-917.
- Díaz M.T., Cañeque V., Sánchez C.I., Lauzurica S., Pérez C., Fernández C., Álvarez I. et De la Fuente J. (2011). "Nutritional and sensory aspects of light lamb meat enriched in n-3 fatty acids during refrigerated storage." *Food Chemistry* **124**(1): 147-155.
- Dring M.J., Wagner A., Boeskov J. et Lüning K. (1996). "Sensitivity of intertidal and subtidal red algae to UVA and UVB radiation, as monitored by chlorophyll fluorescence measurements: Influence of collection depth and season, and length of irradiation." *European Journal of Phycology* **31**(4): 293-302.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. et Smith F. (1956). "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." *Analytical Chemistry* **28**(3): 350-356.
- Ducret A., Müller S.A., Goldie K.N., Hefti A., Sidler W.A., Zuber H. et Engel A. (1998). "Reconstitution, characterisation and mass analysis of the pentacylindrical allophycocyanin core complex from the cyanobacterium *Anabaena sp.* PCC 7120." *Journal of Molecular Biology* **278**(2): 369-388.
- Dufossé L., Galaup P., Yaron A., Malis Arad S., Blanc P., Chidambara Murthy K.N. et Ravishankar G.A. (2005). "Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity of industrial reality?" *Trends in Food Science and Technology* **16**: 389-406.
- Dumay J., Clément N., Moranchais M. et Fleurence J. (2013). "Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction." *Bioresource Technology* **131**(0): 21-27.

Dunlap W.C. et Yamamoto Y. (1995). "Small-molecule antioxidants in marine organisms: Antioxidant activity of mycosporine-glycine." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **112**(1): 105-114.

## F

FAO (2008). "FAO yearbook: Fishery and Aquaculture Statistics." 220 pp.

FAO (2013). "Statistiques des pêches et de l'aquaculture, modules de requêtes en ligne." Date d'accès: 19 Juillet 2013, depuis: <http://www.fao.org/fishery/topic/16140/fr>.

Farnham W.F. et Irvine L.M. (1973). "The addition of a foliose species of *Grateloupia* to the British marine flora." British Phycological Journal **8**: p 208-209.

Farnham W.F. (1980). "Studies on aliens in the marine flora of Southern England." The shore environment. p. A. Londres and New-York, Price, J.H., D.E. Irvine and W. F. Farnham: 875-914.

Figuerola F.L., Korbee N., de Clerck O., Bárbara I. et Ar Gall E. (2007). "Characterization of *Grateloupia lanceola* (Halymeniales, Rhodophyta), an obscure foliose *Grateloupia* from the Iberian Peninsula, based on morphology, comparative sequence analysis and mycosporine-like amino acid composition." European Journal of Phycology **42**(3): 231-242.

Fleurence J. (1991). "L'habilitation des algues en nutrition humaine." Actualités des Industries Alimentaires et Agro-industrielles: 501-502.

Fleurence J., Gutbier G., Mabeau S. et Leray C. (1994). "Fatty acids from 11 marine macroalgae of the French Brittany coast." Journal of Applied Phycology **6**: 527-532.

Fleurence J. et Guyader O. (1995). "Contribution of electrophoresis of red seaweeds (*Gracilaria sp*) used as food ingredients." Sciences des aliments **15**: 43-48.

Fleurence J., Massiani L., Guyader O. et Mabeau S. (1995). "Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa* and *Palmaria palmata*." Journal of Applied Phycology **7**: 393-397.

Fleurence J. (1999a). "Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses." Trends in Food Science and Technology **10**: 25-28.

Fleurence J. (1999b). "The enzymatic degradation of algal cell walls: A useful approach for improving protein accessibility?" Journal of Applied Phycology **11**: 313-314.

Fleurence J. (2003). "R-phycoerythrin from red macroalgae: Strategies for extraction and potential application in biotechnology." Applied Biotechnology, Food Science and Policy **1**: 63-68.

Fleurence J. (2004). "Seaweed proteins". Proteins in food processing. R. Y. Yada. Cambridge; New-York, Woodhead Publishing Limited; CRC Press LLC: 197-213.

Fleurence J., Morançais M., Dumay J., Decottignies P., Turpin V., Munier M., Garcia-Bueno N. et Jaouen P. (2012). "What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?" Trends in Food Science and Technology **27**(1): 57-61.

Floreto E.A.T. et Teshima S. (1998). "The fatty acid composition of seaweeds exposed to different levels of light intensity and salinity." Botanica Marina **41**(1-6): 467-484.

Frank H.A. et Cogdell R.J. (1996). "Carotenoids in photosynthesis." Photochemistry and Photobiology **63**(3): 257-264.

Fu X., Sun L., Yang G., Wang L., Zhao M., Gong X. et Chen M. (2011). "The subunits analysis of R-phycoerythrin from marine red algae by isoelectric focusing." African Journal of Biotechnology **10**(39): 7640-7649.

Fujiwara-Arasaki T., Mino N. et Kuroda M. (1984). "The protein value in human nutrition of edible marine algae in Japan." Hydrobiologia **116/117**: 513-516.

## G

Galland-Irmouli A.-V. (1999). "Etude des propriétés allergéniques et nutritionnelles de protéines d'origine marine (cabillaud, algue rouge *Palmaria palmata*)." Docteur en Génie Biologique et Médical. Université Henri Poincaré Nancy I: 180 pp.

Galland-Irmouli A.-V., Fleurence J., Lamghari R., Luçon M., Rouxel C., Barbaroux O., Bronowicki J.P., Villaume C. et Guéant J.-L. (1999). "Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse)." The Journal of Nutritional Biochemistry **10**(6): 353-359.

Galland-Irmouli A.-V., Pons L., Luçon M., Villaume C., Mrabet N.T., Guéant J.-L. et Fleurence J. (2000). "One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis." Journal of Chromatography B **739**: 117-123.

Gantt E. et Lipschultz C. (1974). "Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*. Pigment analysis." Biochemistry **13**(14): 2960-2966.

Gantt E. (1980). "Structure and function of phycobilisomes: Light harvesting pigment complexes in red and blue-green algae." International Review of Cytology **66**: 45-80.

Gantt E. (1990). "Pigmentation and photoacclimatation." Biology of the Red Algae: 203-219.

Garrett R.H., Grisham C.M. et Lubochinsky B. (2000). "Biochimie." De Boeck Supérieur. 1292 pp.

Gavio B. et Fredericq S. (2002). "*Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) is the correct name of the non-native species in the Atlantic known as *Grateloupia doryphora*." European Journal of Phycology **37**: p 349-359.

Gayral P. et Cosson J. (1986). "Connaitre et reconnaître les algues." Ouest France. 220 pp.

GIP Bretagne environnement (2010). "Les espèces marines invasives en Bretagne." Date d'accès: 22 Juillet 2013, depuis: <http://www.observatoire-biodiversite-bretagne.fr/Chiffres-et-cartes/pressions-et-reponses/Listes-des-especes-introduites-en-Bretagne>.

Glazer A.N. et Cohen-Bazire G. (1971). "Subunit structure of the phycobiliproteins of blue-green algae." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **68**(7): 1398-1401.

Glazer A.N., Cohen-Bazire G. et Stanier R.Y. (1971). "Characterization of phycoerythrin from a *Cryptomonas* sp." Archiv für Mikrobiologie **80**(1): 1-18.

Glazer A.N. et Bryant D.A. (1975). "Allophycocyanin B ( $\lambda_{max}$  671, 618 nm)." Archives of Microbiology **104**(1): 15-22.

Glazer A.N. et Hixson C.S. (1975). "Characterization of R-phycoerythrin. Chromophore content of R-phycoerythrin and C-phycoerythrin." The Journal of Biological Chemistry **250**(14): 5487-5495.

- Glazer A.N. (1976). "Phycocyanins: Structure and function." Photochemical and Photobiological Reviews **1**: 71-115.
- Glazer A.N., Apell G.S., Hixson C.S., Bryant D.A., Rimon S. et Brown D.M. (1976). "Biliproteins of cyanobacteria and Rhodophyta: Homologous family of photosynthetic accessory pigments." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **73**(2): 428-431.
- Glazer A.N. (1977). "Structure and molecular organization of the photosynthetic accessory pigments of cyanobacteria and red algae." Molecular and Cellular Biochemistry **18**(2-3): 125-140.
- Glazer A.N. et Hixson C.S. (1977). "Subunit structure and chromophore composition of Rhodophytan phycocerythrins." The Journal of Biological Chemistry **252**(1): 32-42.
- Glazer A.N. (1982). "Phycobilisomes: Structure and dynamics." Annual Review of Microbiology **36**: 173-198.
- Glazer A.N. (1984). "Phycobilisome: A macromolecular complex optimized for light energy transfer." Biochemica et Biophysica Acta **768**: 29-51.
- Glazer A.N. (1985). "Light-harvesting by phycobilisomes." Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry **14**: 47-77.
- Glazer A.N., Yeh S.W., Webb S.P. et Clark J.H. (1985). "Disk-to-disk transfer as the rate-limiting step for energy flow in phycobilisomes." Science **227**(4685): 419-423.
- Glazer A.N. (1988a). "[31] Phycobiliproteins." Methods in Enzymology **167**: 291-303.
- Glazer A.N. (1988b). "[32] Phycobilisomes." Methods in Enzymology **167**: 304-312.
- Glazer A.N. (1989). "Light guides, directional energy transfer in a photosynthetic antenna." The Journal of Biological Chemistry **264**: 1-4.
- Glazer A.N. et Stryer L. (1990). "[19] Phycobiliprotein-avidin and phycobiliprotein-biotin conjugates". Methods in Enzymology. W. Meir et A. B. Edward, Academic Press: 188-194.
- Glazer A.N. (1994). "Phycobiliproteins: A family of valuable, widely used fluorophores." Journal of Applied Phycology **6**: 105-112.
- Glicksman M. (1987). "Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry." Hydrobiologia **151-152**(1): 31-47.
- González-Aguilar G., Ayala-Zavala J.F., Olivas G.I., Rosa L.A. et Álvarez-Parrilla E. (2010). "Preserving quality of fresh-cut products using safe technologies." Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Journal of Consumer Protection and Food Safety) **5**(1): 65-72.
- Goulard F., Diouris M., Quere G., Deslandes E. et Floc'h J.-Y. (2001). "Salinity effects on NDP-sugars, floridoside, starch, and carrageenan yield, and UDP-glucose-pyrophosphorylase and -epimerase activities of cultivated *Solieria chordalis*." Journal of Plant Physiology **158**: 1387-1394.
- Grimm H., Mayer K., Mayer P. et Eigenbrodt E. (2002). "Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes." British Journal of Nutrition **87**(1): 59-67.
- Guard-Friar D. et MacColl R. (1984). "Spectroscopic properties of tetrapyrroles on denatured biliproteins." Archives of Biochemistry and Biophysics **230**(1): 300-305.
- Guerin M., Huntley M.E. et Olaizola M. (2003). "Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition." Trends in Biotechnology **21**(5): 210-216.

- Guilmo L. (2013). "Une algue rouge pour lutter contre la leucémie." Article de presse, Ouest France, 16/04/2013
- Guimond M.-O. (2004). "Analyse moléculaire de la localisation cellulaire de la petite protéine de choc thermique Hsp27 de *Drosophila melanogaster*." Maitrise ès Sciences en Biologie Cellulaire et Moléculaire. Faculté de Médecine, Université de Laval: 87 pp.
- Guiry M.D. (2013). "Fiche *Grateloupia turuturu* Yamada." Algaebase, Date d'accès: 13/06/2013, 2013, depuis: [http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=4363](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=4363).
- Gupta N.K. et Gupta K.P. (2012). "Effects of C-Phycocyanin on the representative genes of tumor development in mouse skin exposed to 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate." Environmental Toxicology and Pharmacology **34**(3): 941-948.

## H

- Hansen H.R., Hector B.L. et Feldmann J. (2003). "A qualitative and quantitative evaluation of the seaweed diet of North Ronaldsay sheep." Animal Feed Science and Technology **105**(1-4): 21-28.
- Harris P.J. et Ferguson L.R. (1993). "Dietary fibre: Its composition and role in protection against colorectal cancer." Mutation Research **290**(1): 97-110.
- Harun R., Singh M., Forde G.M. et Danquah M.K. (2010). "Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products." Renewable and Sustainable Energy Reviews **14**(3): 1037-1047.
- Havaux M. (1998). "Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts." Trends in Plant Science **3**(4): 147-151.
- Hehemann J.-H., Correc G., Barbeyron T., Helbert W., Czejek M. et Michel G. (2010). "Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota." Nature **464**(7290): 908-912.
- Hellio C., Simon-Colin C., Clare A.S. et Deslandes E. (2004). "Isethionic acid and floridoside isolated from the red alga, *Grateloupia turuturu*, inhibit settlement of *Balanus amphitrite* cyprid larvae." Biofouling **20**(3): 139-145.
- Hendry G.A.F. et Houghton J.D. (1996). "Natural Food Colorants." Blackie Academic & Professional. 348 pp.
- Heo S.-J., Ko S.-C., Kang S.-M., Kang H.-S., Kim J.-P., Kim S.-H., Lee K.-W., Cho M.-G. et Jeon Y.-J. (2008). "Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae *Sargassum siliquastrum* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage." European Food Research and Technology **228**(1): 145-151.
- Hernandez M. et Mercier-Fresnel M.-M. (2006). "Le nouveau précis d'esthétique cosmétique. Préparation aux examens d'état." 7<sup>ème</sup> édition, Broché. 389 pp.
- Hilditch C.M., Balding P., Jenkins R., Smith A.J. et Rogers L.J. (1991). "R-phycoerythrin from the macroalga *Corallina officinalis* (Rhodophyceae) and application of a derived phycofluors probe for detecting sugar-binding sites on cell membranes." Journal of Applied Phycology **3**: 345-354.
- Horrocks L.A. et Yeo Y.K. (1999). "Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA)." Pharmacological Research **40**(3): 211-225.
- Hu F.B., Bronner L., Willett W.C., Stampfer M.J., Rexrode K.M., Albert C.M., Hunter D. et Manson J.E. (2002). "Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart



disease in women." The Journal of the American Medical Association **287**(14): 1815-1821.

Hu F.B., Cho E., Rexrode K.M., Albert C.M. et Manson J.E. (2003). "Fish and long-chain omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease and total mortality in diabetic women." Circulation **107**(14): 1852-1857.

Hudson J.B., Kim J.H., Lee M.K., DeWreede R.E. et Hong Y.K. (1999). "Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds : Evidence for multiple activities." Journal of Applied Phycology **10**(5): 427-434.

Huovinen P., Gómez I., Figueroa Félix L., Ulloa N., Morales V. et Lovengreen C. (2004). "Ultraviolet-absorbing mycosporine-like amino acids in red macroalgae from Chile". Botanica Marina. **47**: 21.

Huovinen P., Matos J., Pinto I.S. et Figueroa F.L. (2006). "The role of ammonium in photoprotection against high irradiance in the red alga *Grateloupia lanceola*." Aquatic Botany **84**(4): 308-316.

## I

INERIS (2013). "EDTA et ses sels." Données technico-économiques sur les substances chimiques en France. Date d'accès: 03 Octobre 2013, depuis: [http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCkQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ineris.fr%2Fsubstances%2Ffr%2Fsubstance%2FgetDocument%2F3042&ei=6LdNUun0Geyh7AbCzIGgAw&usq=AFQjCNEIOp\\_o ud7pG3kobCiqZyzDCWDmUA&sig2=oEwvBfCc4p2EObYdDLqQWw](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCkQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ineris.fr%2Fsubstances%2Ffr%2Fsubstance%2FgetDocument%2F3042&ei=6LdNUun0Geyh7AbCzIGgAw&usq=AFQjCNEIOp_o ud7pG3kobCiqZyzDCWDmUA&sig2=oEwvBfCc4p2EObYdDLqQWw).

Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (2013a). "Azoture de Sodium." Date d'accès: 03 Octobre 2013, depuis: [http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no\\_produit=1594&nom=Azoture+de+sodi um](http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=1594&nom=Azoture+de+sodi um).

Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (2013b). "Mercaptoethanol." Date d'accès: 03 Octobre 2013, depuis: [http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no\\_produit=6742&nom=MERCAPTOETHA NOL](http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=6742&nom=MERCAPTOETHA NOL).

Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (2013c). "EDTA." Date d'accès: 03 Octobre 2013, depuis: [http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no\\_produit=11585&nom=EDTA](http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=11585&nom=EDTA).

Ito K. et Hori K. (1989). "Seaweed: Chemical composition and potential food uses." Food Reviews International **5**(1): 101-144.

## J

Janiak D.S. (2009). "Ecological impacts of the non-native *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) in Long Island sound." University of Connecticut. 168 pp.

Janiak D.S. et Whitlatch R.B. (2012). "Epifaunal and algal assemblages associated with the native *Chondrus crispus* (Stackhouse) and the non-native *Grateloupia turuturu* (Yamada) in eastern Long Island Sound." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **413**: 38-44.

- Jaulneau V., Lafitte C., Jacquet C., Fournier S., Salamagne S., Briand X., Esquerr-Tugay M.T. et Dumas B. (2010). "Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway." Journal of Biomedicine and Biotechnology **2010**: 11 pp.
- Jiménez-Escrig A. et Sanchez-Muniz F.J. (2000). "Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism." Nutrition Research **20**(4): 585-598.
- Jirge S.S. et Chaudhari Y.S. (2010). "Marine: The ultimate source of bioactives and drug metabolites." International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy **1**(1): 55-62.
- Jubeau S. (2012). "Application du concept de bioraffinerie à la valorisation de la microalgue *Porphyridium cruentum*." Docteur en Biotechnologies. Université de Nantes: 180 pp.

## K

- Kaas R. (1998). "The seaweed resources of France". Seaweed resources of the world. I. A. T. C. M. Ohno. Yokosuka, Japan: 233-244.
- Kaixian Q., Franklin M. et Borowitzka M.A. (1993). "The study for isolation and purification of R-phycoerythrin from a red alga." Applied Biochemistry and Biotechnology **43**: 133-139.
- Kaliaperumal N. (2003). "Products from Seaweeds." SDMRI Research Publication **3**: 33-42.
- Kathiresan S., Sarada R., Bhattacharya S. et Ravishankar G.A. (2007). "Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum*." Biotechnology and Bioengineering **96**(3): 456-463.
- Kawashima H., Bazin M.J. et Lynch J.M. (1997). "A modelling study of world protein supply and nitrogen fertilizer demand in the 21st century." Environmental Conservation **24**(01): 50-57.
- Ke B. (2001). "Photosynthesis Photobiochemistry and Photobiophysics." Springer. 765 pp.
- Kendel M., Couzinet-Mossion A., Viau M., Fleurence J., Barnathan G. et Wielgosz-Collin G. (2013). "Seasonal composition of lipids, fatty acids, and sterols in the edible red alga *Grateloupia turuturu*." Journal of Applied Phycology **25**(2): 425-432.
- Kijjoa A. et Sawangwong P. (2004). "Drugs and cosmetics from the sea." Marine Drugs **2**(2): 73-82.
- Kim E.J., Park S.Y., Lee J.Y. et Park J.H. (2010a). "Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells." BMC Gastroenterology **10**: 96.
- Kim K.N., Heo S.J., Kang S.M., Ahn G. et Jeon Y.J. (2010b). "Fucoxanthin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through a ROS-mediated Bcl-xL pathway." Toxicology In Vitro **24**(6): 1648-1654.
- Kim S.K. (2011). "Handbook of marine macroalgae: Biotechnology and applied phycology." Wiley. 608 pp.
- Kirst G.O. (1980). "Low MW carbohydrates and ions in rhodophyceae: Quantitative measurement of floridoside and digeneaside." Phytochemistry **19**(6): 1107-1110.
- Kloareg B. (1981). "Structure et rôle écophysiological des parois des algues littorales: Contribution à la résistance aux variations de salinité." Physiologie Végétale **19**: 427-441.



- Kloareg B. et Quatrano R.S. (1988). "Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides." Oceanography and Marine Biology: an annual review **26**: 259-315.
- Kobylewski S. et Jacobson M. (2010). "Food Dyes: A rainbow of risks." Center for science in the public interest. Date d'accès: 9 Septembre 2013, depuis: <http://cspinet.org/new/pdf/food-dyes-rainbow-of-risks.pdf>.
- Koller K. et Wehrmeyer W. (1975). "B-Phycocerythrin from *Rhodella violacea*." Archives of Microbiology **104**(1): 255-261.
- Korbee N., Figueroa F.L. et Aguilera J. (2005a). "Light quality effects on photosynthesis and accumulation of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta)." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **80**: 71-78.
- Korbee N., Huovinen P., Figueroa F.L., Aguilera J. et Karsten U. (2005b). "Availability of ammonium influences photosynthesis and the accumulation of mycosporine-like amino acids in two *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta)." Marine Biology **146**: 645-654.
- Kornprobst J.M. (2005). "Substances naturelles d'origine marine: chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies. Volume 1." Tec et Doc. 1830 pp.
- Kronick M.N. (1986). "The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay." Journal of Immunological Methods **92**(1): 1-13.

## L

- Laemmli U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lafontaine N., Mussio I. et Rusig A.-M. (2011). "Production and regeneration of protoplasts from *Grateloupia turuturu* Yamada (Rhodophyta)." Journal of Applied Phycology **23**: 17-24.
- Lahaye M. et Kaeffer B. (1997). "Les fibres algales." Paris, FRANCE, Masson. 90 pp.
- Leblanc B. (2013). "Biochimie des protéines." Date d'accès: 04 Octobre 2013, depuis: <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/>.
- Lee B. (2008). "Seaweed : Potential as a marine vegetable and other opportunities." Barton, A.C.T., Rural Industries Research and Development Corporation. 46 pp.
- Li K., Li X. et Wang B. (2008). "Chemical constituents of the red alga *Grateloupia turuturu*." Journal of Biotechnology **136**: S598-S599.
- Li Y., Zhang J., Xie J., Zhao J. et Jiang L. (2001). "Temperature-induced decoupling of phycobilisomes from reaction centers." Biochimica et Biophysica Acta **1504**: 229-234.
- Liu L.-N., Chen X.-L., Zhang X.-Y., Zhang Y.-Z. et Zhou B.-C. (2005). "One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*." Journal of Biotechnology **116**: 91-100.
- Liu L.-N., Su H.-N., Yan S.-G., Shao S.-M., Xie B.-B., Chen X.-L., Zhang X.-Y., Zhou B.-C. et Zhang Y.-Z. (2009). "Probing the pH sensitivity of R-phycoerythrin: Investigations of active conformational and functional variation." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1787**(7): 939-946.

- Liu Y., Xu L., Cheng N., Lin L. et Zhang C. (2000). "Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells." Journal of Applied Phycology **12**(2): 125-130.
- Lobban C.S. et Harrison P.J. (1994). "Seaweed Ecology and Physiology." Cambridge University Press. 366 pp.
- Lüning K. (1990). "Seaweeds: Their environment, biogeography, and ecophysiology." Wiley. 544 pp.

## M

- Mabeau S., Cavaloc E., Fleurence J. et Lahaye M. (1992). "New seaweed based ingredients food industry." International Food Ingredient **3**: 38-45.
- MacColl R. et Eisele L.E. (1996). "R-phycoerythrins having two conformations for the same aggregate." Biophysical Chemistry **61**: 161-167.
- MacColl R., Eisele L.E., Williams E.C. et Bowser S.S. (1996). "The discovery of a novel R-phycoerythrin from an antarctic red alga." The Journal of Biological Chemistry **271**(29): 17157-17160.
- MacColl R., Eisele L.E., Malak H., Endres R.L., Williams E.C. et Bowser S.S. (1999). "Studies on R-phycoerythrins from two antarctic marine red algae and a mesophilic red alga." Polar Biology **22**: 384-388.
- Maeda H., Tsukui T., Sashima T., Hosokawa M. et Miyashita K. (2008). "Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as a multi-functional nutrient." Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition **17**: 196-199.
- Makki F. et Durance T.D. (1996). "Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effect in beer." Food Research International **29**(7): 635-645.
- Marston M. et Villalard-Bohnsack M. (2002). "Genetic variability and potential sources of *Grateloupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta), an invasive species in Rhode Island waters (USA)." Journal of Phycology **38**(4): 649-658.
- Mathieson A., Dawes C., Pederson J., Gladych R. et Carlton J. (2008). "The Asian red seaweed *Grateloupia turuturu* (Rhodophyta) invades the Gulf of Maine." Biological Invasions **10**(7): 985-988.
- Mathlouthi (2013). "Les propriétés physiques et chimiques du saccharose." Dossier CEDUS  
Date d'accès: 04 Octobre 2013, depuis:  
[http://www.lesucre.com/blocs/proprietes\\_saccharose-pdf.pdf](http://www.lesucre.com/blocs/proprietes_saccharose-pdf.pdf).
- Mayer A.M.S. et Hamann M.T. (2004). "Marine pharmacology in 2000: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action." Marine Biotechnology **6**: 37-52.
- Mc Hugh D.J. (2003). "A guide to the seaweed industry." Roma, Italy, FAO fisheries technical paper n° 411. 105 pp.
- Miller G.L. et Miller E.E. (1948). "Determination of nitrogen in biological materials." Analytical Chemistry **20**(5): 481-488.

- Mimuro M. et Akimoto S. (2003). "Carotenoids of light harvesting systems: Energy transfer processes from fucoxanthin and peridinin to chlorophyll". Photosynthesis in Algae. A. D. Larkum, S. Douglas et J. Raven, Springer Netherlands. **15**: 335-349.
- Ministère de l'écologie du développement durable et de l'énergie (2010). "La biodiversité marine, qu'est-ce que c'est?" Date d'accès: 16 Juillet 2013, depuis: <http://www.developpement-durable.gouv.fr/La-biodiversite-marine-qu-est-ce.html>.
- Minkova K.M., Tchernov A.A., Tchordadjieva M.I., Fournadjieva S.T., Antova R.E. et Busheva M. (2003). "Purification of C-phycoyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*." Journal of Biotechnology **102**(1): 55-59.
- Mishra S.K., Shrivastav A. et Mishra S. (2008). "Effect of preservatives for food grade C-PC from *Spirulina platensis*." Process Biochemistry **43**(4): 339-345.
- Mishra S.K., Shrivastav A., Pancha I., Jain D. et Mishra S. (2010). "Effect of preservatives for food grade C-Phycoerythrin, isolated from marine cyanobacteria *Pseudanabaena sp.*" International Journal of Biological Macromolecules **47**(5): 597-602.
- Mishra S.K., Shrivastav A., Maurya R.R., Patidar S.K., Haldar S. et Mishra S. (2012). "Effect of light quality on the C-phycoerythrin production in marine cyanobacteria *Pseudanabaena sp.* isolated from Gujarat coast, India." Protein Expression and Purification **81**(1): 5-10.
- Misurcova L. (2011). "Chemical Composition of Seaweeds". Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology. S.-K. Kim, John Wiley & Sons Ltd. **Chapitre 7**: 173-192.
- Miyazawa K. et Ito K. (1974a). "Isolation of L-methionine-*l*-sulfoxide and N-methylmethionine sulfoxide from a red alga *Grateloupia turuturu*." Nippon Suisan Gakkaishi **40**(7): 655-660.
- Miyazawa K. et Ito K. (1974b). "Isolation of a new peptide, L-citrullinyl-L-arginine, from a red alga *Grateloupia turuturu*." Nippon Suisan Gakkaishi **40**(8): 815-818.
- Mohamed S., Hashim S.N. et Rahman H.A. (2012). "Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy." Trends in Food Science and Technology **23**(2): 83-96.

## N

- Neale P.J., Banaszak A.T. et Jarriel C.R. (1998). "Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguineum* (Dinophyceae): Mycosporine-Like Amino Acids protect against inhibition of photosynthesis." Journal of Phycology **34**(6): 928-938.
- Ngo D.-H., Wijesekara I., Vo T.-S., Ta Q.V. et Kim S.K. (2011). "Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview." Food Research International **44**: 523-529.
- Nguyen H. et Kim S.M. (2012). "Antioxidative, anticholinesterase and antityrosinase activities of the red alga *Grateloupia lancifolia* extracts." African Journal of Biotechnology **11**(39): 9457-9467.
- Niir Board Of Consultants and Engineers (2006). "The complete book on natural dyes & pigments." Asia Pacific Business Press. 404 pp.
- Niu J.-F., Wang G.-C. et Tseng C.-K. (2006). "Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Polysiphonia urceolata* Grev." Protein Expression and Purification **49**: 23-31.

Nolan D.N. et O'Heocha C. (1967). "Determination of molecular weights of algal biliproteins by gel filtration." Biochemical Journal **103**: 39.

Norziah M.H. et Ching C.Y. (2000). "Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*." Food Chemistry **68**(1): 69-76.

## O

O'Heocha C. (1971). "Pigments of the red algae." Oceanography and Marine Biology: Annual Review **9**: 61-82.

Ogawa H., Mizuno H., Saito T., Yamada Y., Oohusa T. et Iso N. (1991). "Effects of pH on the conformation of phycoerythrin from nori *Porphyra sp.*" Nippon Suisan Gakkaishi **57**(5): 899-903.

Ohad I., Schneider H.-J.A.W., Gendel S. et Bogorad L. (1980). "Light-induced changes in allophycocyanin." Plant Physiology **65**(1): 6-12.

Oi V.T., Glazer A.N. et Stryer L. (1982). "Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules." Journal of Cell Biology **93**(3): 981-986.

Oren A. (2005). "A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005." Saline Systems **1**: 1-14.

Orta-Ramirez A., Merrill J.E. et Smith D.M. (2000). "pH affects the thermal inactivation parameters of R-Phycoerythrin from *Porphyra yezoensis*." Journal of Food Science **65**(6): 1046-1050.

Orta-Ramirez A., Merrill J.E. et Smith D.M. (2001). "Sucrose, sodium dodecyl sulfate, urea, and 2-mercaptoethanol affect the thermal inactivation of R-Phycoerythrin." Journal of Food Protection **64**(11): 1806-1811.

Ortiz J., Romero N., Robert P., Araya J., Lopez-Hernández J., Bozzo C., Navarrete E., Osorio A. et Rios A. (2006). "Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*." Food Chemistry **99**(1): 98-104.

## P

Palozza P. et Krinsky N.I. (1992). "Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model." Archives of Biochemistry and Biophysics **297**(2): 291-295.

Pang S.J., Xiao T., Shan T.F., Wang Z.F. et Gao S.Q. (2006). "Evidences of the intertidal red alga *Grateloupia turuturu* in turning *Vibrio parahaemolyticus* into non-culturable state in the presence of light." Aquaculture **260**: 369-374.

Parlement Européen et Conseil du 16 Décembre 2008. Journal officiel de l'Union Européenne, Règlement (CE) N°1333/2008 sur les additifs alimentaires. 18 pp.

Paul V.J. et Puglisi M.P. (2004). "Chemical mediation of interactions among marine organisms." Natural Product Reports **21**(1): 189-209.

Perez-Garcia O., Escalante F.M.E., de-Bashan L.E. et Bashan Y. (2011). "Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products." Water Research **45**(1): 11-36.

Pérez R. (1997). "Ces algues qui nous entourent: conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture." IFREMER Plouzané, IFREMER. 272 pp.

- Plaza M., Cifuentes A. et Ibanez E. (2008). "In the search of new functional food ingredients from algae." Trends in Food Science and Technology **19**(1): 31-39.
- Plouguerné E. (2006). "Etude 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." Docteur en chimie marine. Université de Bretagne Occidentale: 248 pp.
- Plouguerné E., Kikuchi H., Oshima Y., Deslandes E. et Stiger-Pouvreau V. (2006). "Isolation of Cholest-5-en-3-ol formate from the red alga *Grateloupia turuturu* Yamada and its chemotaxonomic significance." Biochemical Systematics and Ecology **34**(9): 714-717.
- Potter A., Baltenneck C., Schultze X. et Prudhomme E. (2013). "Association de carraghénane et de c-glycoside et leurs utilisations". *L'oréal PCT/FR2012/051991*.
- Pumas C., Peerapornpisal Y., Vacharapiyasophon P., Leelapornpisid P., Boonchum W., Ishii M. et Khanongnuch C. (2012). "Purification and characterization of a thermostable phycoerythrin from hot spring cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. KC45." International Journal of Agriculture and Biology **14**: 121-125.

## Q

- Quillet M. et De Lestang G. (1978). "Action synergique à l'égard de l'eau de certaines associations de polysaccharides dans les parois des fucales et gigartinales." Bulletin de la Société Phycologique de France **23**: 88-93.

## R

- Ramus J., Beale S.I. et Mauzerall D. (1976a). "Correlation of changes in pigment content with photosynthetic capacity of seaweeds as a function of water depth." Marine Biology **37**(3): 231-238.
- Ramus J., Beale S.I., Mauzerall D. et Howard K.L. (1976b). "Changes in photosynthetic pigment concentration in seaweeds as a function of water depth." Marine Biology **37**(3): 223-229.
- Ranjitha K. et Kaushik B.D. (2005). "Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*." Journal of Scientific & Industrial Research **64**: 372-375.
- Reboloso Fuentes M.M., Ación Fernandez G.G. et Sanchez Pérez J.A. (2000). "Biomass nutrient profiles of the microalga *Prophyridium cruentum*." Food Chemistry **70**: 345-353.
- Reed R.H. (1983). "Taxonomic implications of osmoacclimation in *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler." Phycologia **22**(4): 351-354.
- Rees D.A. (1962). "Some properties of the cell wall mucilage of marine algae." British Phycological Bulletin **2**: 180-181.
- Rees D.A. et Conway E. (1962). "The structure and biosynthesis of porphyrin: A comparison of some samples." Biochemical Journal **84**: 411-416.
- Reis A., Mendes A., Lobo-Fernandes H., Empis J.A. et Novais J.M. (1998). "Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp." Bioresource Technology **66**(3): 181-187.



- Rhee C. et Briggs W.R. (1977). "Some responses of *Chondrus crispus* to light. I. Pigmentation changes in the natural habitat." Botanical Gazette **138**(2): 123-128.
- Riouall R., Guiry M.D. et Codomier L. (1985). "Introduction d'une espèce foliacée de *Grateloupia* dans la flore marine de l'étang de Thau (Hérault, France)." Cryptogamie: Algologie **6**(2): 91-98.
- Robic A. (2008). "Etude de la variabilité chimique, physico-chimique et rhéologique des ulvanes, polysaccharides des parois cellulaires d'algues marines vertes de la famille des Ulves (Ulvales, Chlorophytes)." Doctorat Biotechnologies végétales. Université de Nantes, UFR sciences et techniques: 174 pp.
- Robic A., Sassi J.-F., Dion P., Lerat Y. et Lahaye M. (2009). "Seasonal variability of physico-chemical and rheological properties of ulvan in two *Ulva* species (Chlorophyta) from the Brittany coast." Journal of Phycology **45**(4): 962-973.
- Roland J.C., Bouteau H.E.M. et Bouteau F. (2008). "Atlas de Biologie Végétale." 7ème, Dunod. 152 pp.
- Romay C., Gonzalez R., Ledon N., Ramirez D. et Rimbau V. (2003). "C-phycoocyanin: A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects." Current Protein & Peptide Science **4**(3): 207-216.
- Rosen G., Langdon C.J. et Evans F. (2000). "The nutritional value of *Palmaria mollis* cultured under different light intensities and water exchange rates for juvenile red abalone *Haliotis rufescens*." Aquaculture **185**(1–2): 121-136.
- Rossano R., Ungaro N., D'Ambrosio A., Liuzzi G.M. et Riccio P. (2003). "Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata* Ellis & Solander." Journal of Biotechnology **101**: 289-293.
- Rowan K.S. (1989). "Photosynthetic Pigments of Algae." Cambridge University Press. 334 pp.
- Rymer C., Gibbs R.A. et Givens D.I. (2010). "Comparison of algal and fish sources on the oxidative stability of poultry meat and its enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids." Poultry Science **89**(1): 150-159.

## S

- Samaraweera A.M., Vidanarachchi J.K. et Kurukulasuriya M.S. (2011). "Industrial Applications of Macroalgae". Handbook of Marine Macroalgae, John Wiley & Sons, Ltd. **33**: 500-521.
- Sampath-Wiley P., Neefus C.D. et Jahnke L.S. (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**(2): 83-91.
- Sartal C.G., Alonso M.C.B. et Bermejo Barrera P. (2011). "Application of Seaweeds in the Food Industry". Handbook of Marine Macroalgae, John Wiley & Sons, Ltd. **34**: 522-531.
- Saunders G.W. et Withall R.D. (2006). "Collections of the invasive species *Grateloupia turuturu* (Halymeniales, Rhodophyta) from Tasmania, Australia." Phycologia **45**(6): 711-714.

- Schwedhelm E., Maas R., Freese R., Jung D., Lukacs Z., Jambrecina A., Spickler W., Schulze F. et Böger R.H. (2008). "Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: Impact on nitric oxide metabolism." British Journal of Clinical Pharmacology **65**(1): 51-59.
- Sekar S. et Chandramohan M. (2008). "Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization." Journal of Applied Phycology **20**(2): 113-136.
- Shanmugam M. et Mody K.H. (2000). "Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents." Current Science **79**(12): 1672-1683.
- Shao K., Wang J. et Zhou B. (2004). "Production and application of filaments of *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta)." Journal of Applied Phycology **16**(6): 431-437.
- Shih S.-R., Tsai K.-N., Li Y.-S., Chueh C.-C. et Chan E.-C. (2003). "Inhibition of enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *Spirulina platensis*." Journal of Medical Virology **70**(1): 119-125.
- Shimonaga T., Fujiwara S., Kaneko M., Izumo A., Nihei S., Francisco P.B., Jr., Satoh A., Fujita N., Nakamura Y. et Tsuzuki M. (2007). "Variation in storage alpha-polyglucans of red algae: Amylose and semi-amylopectin types in *Porphyridium* and glycogen type in *Cyanidium*." Marine Biotechnology (NY) **9**(2): 192-202.
- Simon-Colin C. (2001). "Applications de la résonance magnétique nucléaire à l'étude des solutés organiques majeurs potentiellement impliqués dans l'ajustement osmotique chez l'algue rouge invasive *Grateloupia doryphora* (Montagne) Howe." Docteur en Océanologie Biologique. Université de Bretagne Occidentale: 282 pp.
- Simon-Colin C., Kervarec N., Pichon R. et Deslandes E. (2004). "NMR <sup>13</sup>C-isotopic enrichment experiments to study carbon-partitioning into organic solutes in the red alga *Grateloupia doryphora*." Plant Physiology and Biochemistry **42**: 21-26.
- Simon C., Ar Gall E. et Deslandes E. (2001). "Expansion of the red alga *Grateloupia doryphora* along the coasts of Brittany (France)." Hydrobiologia **443**: 23-29.
- Société Chimique de France (2013). "Azoture de sodium." Date d'accès: 03 Octobre 2013, depuis: <http://www.societechimiquedefrance.fr/produit-du-jour/azoture-de-sodium.html>.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. et Isambert A. (2006). "Commercial applications of microalgae." Journal of Bioscience and Bioengineering **101**(2): 87-96.
- Stahl W. et Sies H. (1996). "Lycopene: A biologically important carotenoid for humans?" Archives of Biochemistry and Biophysics **336**(1): 1-9.
- Stiger V. et Payri C.E. (1999). "Spatial and seasonal variations in the biological characteristics of two invasive brown algae, *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh and *Sargassum mangarevense* (Grunow) Setchell (Sargassaceae, Fucales). Spreading on the reefs of Tahiti (French Polynesia)." Botanica Marina **42**: 295-306.
- Sun L., Wang S., Gong X. et Chen L. (2004). "A rod-linker-contained R-phycoerythrin complex from the intact phycobilisome of the marine red alga *Polysiphonia urceolata*." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **76**(1-3): 1-11.
- Sun L., Wang S., Gong X., Zhao M., Fu X. et Wang L. (2009). "Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*." Protein Expression and Purification **64**: 146-154.



## T

- Taboada C., Millan R. et Miguez I. (2010). "Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida*." Journal of the Science of Food and Agriculture **90**(3): 445-449.
- Takashi K. et Takahiko I. (2009). "Minerals, polysaccharides and antioxidant properties of aqueous solutions obtained from macroalgal beach-casts in the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan." Food Chemistry **112**(3): 575-581.
- Talarico L. (1996). "Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: Adaptive responses to light." Scientia Marina **60**: 205-222.
- Talarico L. et Maranzana G. (2000). "Light and adaptive responses in red macroalgae: An overview." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **56**: 1-11.
- Tandeau de Marsac N. et Cohen-bazire G. (1977). "Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes." Proceedings of the National Academy of Sciences **74**(4): 1635-1639.
- Tandeau de Marsac N., Castets A.M. et Cohen-Bazire G. (1980). "Wavelength modulation of phycoerythrin synthesis in *Synechocystis* sp. 6701." Journal of Bacteriology **142**(1): 310-314.
- Tandeau de Marsac N. (2003). "Phycobiliproteins and phycobilisomes: The early observations." Photosynthesis Research **76**: 197-205.
- Tchernov A.A., Minkova K.M., Georgiev D.I. et Houbavenska N.B. (1993). "Method for B-phycoerythrin purification from *Porphyridium cruentum*." Biotechnology Techniques **7**(12): 853-858.
- Telford W.G., Moss M.W., Morseman J.P. et Allnut F.C. (2001). "Cryptomonad algal phycobiliproteins as fluorochromes for extracellular and intracellular antigen detection by flow cytometry." Cytometry **44**: 16-23.

## V

- Van den Hoek C. (1978). "The possible significance of long-range dispersal for the biogeography of seaweeds." Helgolander Meeresuntersuchungen **41**: 261-272.
- Viera M.P., Gómez Pinchetti J.L., Courtois de Vicose G., Bilbao A., Suárez S., Haroun R.J. et Izquierdo M.S. (2005). "Suitability of three red macroalgae as a feed for the abalone *Haliotis tuberculata* coccinea Reeve." Aquaculture **248**(1-4): 75-82.
- Villalard-Bohnsack M. et Harlin M.M. (1992). "Seasonal distribution and reproductive status of macroalgae in Narragansett Bay and associated waters, Rhode Island, USA " Botanica Marina **35**: 205-214.
- Villalard-Bohnsack M. et Harlin M.M. (1997). "The appearance of *Grateloupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta) on the northeast coast of North America." Phycologia **36**(4): 324-328.
- Villalard-Bohnsack M. et Harlin M.M. (2001). "*Grateloupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta) in Rhode Island waters (USA): Geographical expansion, morphological variations and associated algae." Phycologia **40**(4): 372-380

Viola R., Nyvall P. et Pedersen M. (2001). "The unique features of starch metabolism in red algae." Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences **268**(1474): 1417-1422.

Vishnevetsky M., Ovadis M. et Vainstein A. (1999). "Carotenoid sequestration in plants: The role of carotenoid-associated proteins." Trends in Plant Science **4**(6): 232-235.

Vo T.-S., Ngo D.-H. et Kim S.-K. (2011). "Anti-HIV Activities of Marine Macroalgae". Handbook of Marine Macroalgae, John Wiley & Sons, Ltd. **25**: 415-423.

## W

Wajahatullah K., Rayirath U., Subramanian S., Jithesh M., Rayorath P., Hodges D.M., Critchley A., Craigie J., Norrie J. et Prithiviraj B. (2009). "Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development." Journal of Plant Growth Regulation **28**(4): 386-399.

Wang G.-C., Sun H.-B., Fan X. et Tseng C.-K. (2002). "Large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Palamaria palmata* using the expanded bed adsorption method." Acta Botanica Sinica **44**(5): 541-546.

Wang G., Zhou B. et Zeng C. (1998). "Isolation, properties and spatial site analysis of  $\gamma$  subunits of B-phycoerythrin and R-phycoerythrin." Science in China (Series C) **41**(1): 9-17.

Wang G. (2002). "Isolation and purification of phycoerythrin from red alga *Gracilaria verrucosa* by expanded bed adsorption and ion-exchange chromatography." Chromatographia **56**: 509-513.

Wang G., Jiang C., Wang S., Wei X. et Zhao F. (2012). "Early development of *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta)." Chinese Journal of Oceanology and Limnology **30**(2): 264-268.

Wang S.C., Bligh S.W.A., Shi S.S., Wang Z.T., Hu Z.B., Crowder J., Branford-White C. et Vella C. (2007). "Structural features and anti-HIV-1 activity of novel polysaccharides from red algae *Grateloupia longifolia* and *Grateloupia filicina*." International Journal of Biological Macromolecules **41**(4): 369-375.

Weihai Qingzheng Foods Co. L. (2013). Date d'accès: 16 Avril 2013, depuis: <http://www.21food.com/showroom/349804/product/grateloupia-spp.html>.

Wilkes R.J., Morabito M. et Gargiulo G.M. (2006). "Taxonomic considerations of a foliose *Grateloupia* species from the Straits of Messina." Journal of Applied Phycology **18**: 663-669.

Wissgott U. et Bortlik K. (1996). "Prospects for new natural food colorants." Trends in Food Science and Technology **7**(9): 298-302.

Wong S.-L. et Chang J. (2000). "Salinity and light effects on growth, photosynthesis, and respiration of *Grateloupia filicina* (Rhodophyta)." Aquaculture **182**(3-4): 387-395.

## Y

Yamada Y. (1941). "Notes on some Japanese algae IX." Scientific Papers of the Institute of Algological Research Faculty of Science Hokkaido University **2**: 195-234.

- Yang J.-L., Liu L.-L., Wang B.-G. et Shi Y.-P. (2010). "Secondary metabolites from *Grateloupia turuturu* and their chemotaxonomic significance." Biochemical Systematics and Ecology **38**(4): 850-852.
- Yu M.H., Glazer A.N., Spencer K.G. et West J.A. (1981). "Phycoerythrins of the red alga *Callithamnion*: Variation in phycoerythrobilin and phycourobilin content." Plant Physiology **68**(2): 482-488.
- Yu S. et Pedersén M. (1990). "The effect of salinity changes on the activity of  $\alpha$ -galactosidase of the red algae *Gracilaria sordida* and *G. tenuistipitata*". Botanica Marina. **33**: 385.

## Z

- Zhang L., Li L. et Wu Q. (2007). "Protective effects of mycosporine-like amino acids of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and their partial characterization." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **86**(3): 240-245.
- Zhang Y.M. et Chen F. (1999). "A simple method for efficient separation and purification of C-phycoerythrin and allophycoerythrin from *Spirulina platensis*." Biotechnology Techniques **13**: 601-603.



## Glossaire

---

### A

**Activité de l'eau** (p.148) : principal paramètre influençant la conservation d'un aliment ou d'un produit pharmaceutique ou cosmétique. Il s'agit de la disponibilité de l'eau pour les microorganismes. Plus la quantité d'eau libre est importante et plus les micro-organismes se développeront.

**Ao-nori** (p.11) : nom commercial japonais utilisé pour désigner les Entéromorphes (Ordre des *Ulvaes*)

**Autotrophe** (p.5) : qualifie un organisme capable de synthétiser de la matière organique à partir de la matière minérale, en utilisant, soit l'énergie lumineuse (organisme photoautotrophe, photosynthétique), soit l'énergie chimique (organisme chimioautotrophe).

---

### B

**Bilirubine** (p.15) : pigment jaune issu de la dégradation de l'hème. Elle a une structure tétrapyrrolique ouverte linéaire.

**Biliverdine** (p.15) : pigment vert issu de la dégradation de l'hème, précurseur de la bilirubine. Elle a une structure tétrapyrrolique ouverte non linéaire.

---

### C

**Chromophore** (p.14) : partie d'une molécule responsable de sa couleur.

**Chrysophycées** (p.13) : algues unicellulaires de couleur jaune doré généralement d'eau douce vivant seules ou en colonies.

**Colloïde** (p.32) : substance liquide ou semi-solide contenant des particules en suspension de petite taille pour former une dispersion homogène soit un système biphasique. On parle de suspension colloïdale et non de solution.

**Cortex** (p.87) : partie anatomique périphérique d'un organisme.

**Crampon** (p.47) : organe de fixation de certaines algues.

**Cryptophycées** (p.17) : algues unicellulaires vivant dans tout milieu aquatique (milieux océaniques aux eaux douces) de couleur brune.

---

### D

**Dessalure** (p.57) : réduction de la salinité de l'eau de mer résultant soit d'un mélange d'une eau marine avec une eau continentale, soit de la pluie.

**Dulse** (p.11) : nom commercial anglais utilisé pour désigner l'algue rouge *Palmaria palmata* consommée comme légume de mer.

---

## E

**Endophyte** (p.58) : organisme se développant à l'intérieur d'un végétal de manière symbiotique (endosymbiote).

**Endozoïque** (p.58) : organisme se développant à l'intérieur d'un animal, sans pour autant en être le parasite.

**Épaississant** (p.9) : substance qui va augmenter la viscosité du liquide auquel il est additionné.

**Épiphyte** (p.58) : organisme vivant sur un végétal, sans pour autant en être le parasite.

**Épizoïque** (p.58) : organisme vivant sur un animal, sans pour autant en être le parasite.

**Euryhalin** (p.47) : organisme supportant des variations de salinité importantes du milieu aquatique où il vit (s'oppose à sténohalin).

**Eurytherme** (p.47) : organisme capable de supporter de grandes variations de température (s'oppose à sténotherme).

---

## F

**Flot** (p.97) : courant de marée qui commence à basse mer (s'oppose à jusant).

**Foliacée** (p.47) : en forme de feuille.

**Fluorescence** (p.19) : propriété de certains composés qui, lorsqu'ils reçoivent une radiation, en émettent ensuite une moins énergétique, c'est-à-dire de plus grande longueur d'onde.

**Fucales** (p.34) : ordre d'algues brunes de la classe des Phaeophyceae. Il comprend des macroalgues intertidales poussant en étant pour la plupart ancrées sur substrats durs tels que les espèces des genres Fucus et Sargassum.

---

## G

**Gélifiant** (p.28) : substance destinée à gélifier. Le gélifiant agit en modifiant la structure interne du liquide auquel il est additionné, à chaud ou à froid, aboutissant à une structure finale tridimensionnelle par réticulation.

---

## H

**Hydrodynamisme** (p.52) : état d'agitation des masses d'eau.

---

## J

**Jusant** (p.97) : courant de marée qui commence à haute mer.

---

## L

**Lancéolé** (p.47) : en forme de fer de lance.

---

## M

**Medulla** (p.87) : partie qui se trouve au centre d'un organisme.

---

## N

**Nori** (p.11) : nom commercial japonais utilisé pour désigner essentiellement les algues rouges du genre *Porphyra* consommées comme légumes de mer.

---

## P

**Photooxydation** (p.14) : oxydation sous l'effet de l'énergie lumineuse.

**Photopériode** (p.53) : succession régulière de l'alternance d'une période de lumière (jour) et d'une période d'obscurité (nuit) définies.

**Photophile** (p.54) : organisme qui apprécie la lumière (s'oppose à sciaphile).

**Phycocolloïde** (p.28) : substance mucilagineuse (qui gonfle au contact de l'eau) extraite des algues (alginates, carraghénanes, agars).

**Plaste** (p.5) : organite cellulaire pouvant contenir des pigments (chloroplastes, chromoplastes) ou diverses substances nutritives (amyloplast).

**Potentiel hydrique** (p.9) : il est noté  $\Psi$  et représente le potentiel de l'eau à quitter un compartiment biologique ou chimique donné. Plus il est élevé dans un compartiment et plus l'eau a tendance à le quitter. Toute substance en solution aqueuse exerce une force d'attraction sur les molécules d'eau. Plus la solution est concentrée et plus cette force d'attraction est forte et moins les molécules d'eau pourront la quitter.

---

## R

**Réticulation** (p.35) : passage d'un polymère d'un état où les macromolécules sont indépendantes à un état où elles sont reliées par des liaisons chimiques.

**Rhéologie** (p.35) : science qui étudie et décrit l'écoulement, la déformation et la rupture de corps sous l'effet d'une contrainte.

---

## S

**Sciaphile** (p.54) : organisme qui apprécie les zones d'ombre (s'oppose à photophile).

**Sténohalin** (p.56) : organisme incapable de supporter de grandes variations de salinité (s'oppose à euryhalin).

**Sténotherme** (p.55) : organisme incapable de supporter de grandes variations de température (s'oppose à eurytherme).

**Synérèse** (p.9) : lorsque l'état d'agrégation du gel est assez élevé, il y a expulsion de solvant par concentration des mailles, le gel devient rigide.

---

## T

**Thalle** (p.8) : tissu végétal composé de cellules non différenciées, dépourvu d'appareil vasculaire où l'on ne reconnaît ni feuilles, ni tiges, ni racines, qui constitue l'appareil végétatif des thallophytes.

**Thallophyte** (p.5) : végétaux constitués d'un thalle.



**Thylakoïde (ou thylacoïde)** (p.5) : système de membranes, indépendantes de la membrane plasmique et portant ou contenant les pigments photosynthétiques des cyanophycées et des plastes.

---

## **W**

**Wakame** (p.11) : nom commercial japonais utilisé pour désigner l'algue brune *Undaria pinnatifida* consommée comme légume de mer.

---

## **X**

**Xanthophycées** (p.13) : algues unicellulaires généralement d'eau douce apparentées aux algues brunes quoi que de couleur jaune-verte.

# Annexe 1

Variation in the Biochemical Composition of the Edible Seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada Harvested from Two Sampling Sites on the Brittany Coast (France): The Influence of Storage Method on the Extraction of the Seaweed Pigment R-Phycoerythrin.

Journal of Chemistry

Référence:

Munier M., Dumay J., Morançais M., Jaouen P. and Fleurence J. (2013). "Variation in the Biochemical Composition of the Edible Seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada Harvested from Two Sampling Sites on the Brittany Coast (France): The Influence of Storage Method on the Extraction of the Seaweed Pigment R-Phycoerythrin." Journal of Chemistry **2013**: 8.



## Research Article

# Variation in the Biochemical Composition of the Edible Seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada Harvested from Two Sampling Sites on the Brittany Coast (France): The Influence of Storage Method on the Extraction of the Seaweed Pigment R-Phycoerythrin

Mathilde Munier,<sup>1</sup> Justine Dumay,<sup>1</sup> Michèle Morançais,<sup>1</sup>  
Pascal Jaouen,<sup>2</sup> and Joël Fleurence<sup>1</sup>

<sup>1</sup> FR CNRS Université de Nantes-Ifremer 3473 MMS, Pôle Mer et Littoral, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 3, France

<sup>2</sup> FR CNRS Université de Nantes-Ifremer 3473 MMS, 37 boulevard de l'Université, BP 406, 44602 Saint-Nazaire Cedex, France

Correspondence should be addressed to Joël Fleurence; joel.fleurence@univ-nantes.fr

Received 16 November 2012; Revised 4 January 2013; Accepted 21 January 2013

Academic Editor: Gerald Culioli

Copyright © 2013 Mathilde Munier et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Numerous studies have demonstrated that the biochemical content of seaweeds varies according to seasonality in a restricted area. In this study, the influence of sampling site on the biochemical composition of the edible red seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada was investigated, but not its variation over time. Some differences in water-soluble protein ( $7.19 \pm 0.74 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$  and  $19.15 \pm 0.47 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$ ), water-soluble carbohydrate ( $16.05 \pm 0.82 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$  and  $41.57 \pm 0.66 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$ ), and lipid contents ( $28.07 \pm 5.12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$  and  $54.35 \pm 2.05 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$ ) were recorded between the two sites chosen on the Brittany coast (France). The yield of R-phycoerythrin (R-PE) contained in the seaweed also varied according to the sampling site ( $1.16 \pm 0.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$  versus  $4.39 \pm 0.15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$ ). In addition, the effect of storage conditions on the preservation of R-PE was studied. The results demonstrated that freezing is the best preservation method in terms of R-PE extraction yield and purity index. In conclusion, this study shows that the sampling site influences the biochemical content of the red seaweed *Grateloupia turuturu*. Moreover, the extraction yield of R-phycoerythrin and its purity index depend on both the sampling site and the sample storage method.

## 1. Introduction

For many years, marine ecosystems have been subjected to species introductions. Particularly on the Atlantic West Coast of Europe, many seaweed species have been introduced from Asian countries such as China, Korea, and Japan [1]. In these countries, seaweeds are used as human food and provide valuable nutrition [2]. In addition, the R-phycoerythrin pigment extracted from red seaweeds is used in Japan as a food colorant. In European countries, there is no tradition of the use of algae as sea vegetables. Thus, they are mainly harvested for the production of hydrocolloids such as alginates, agar,

or carrageenans [3]. However, due to the recent interest in nutrition, the food value of seaweeds has been reassessed by considering the significant amounts of proteins, vitamins, minerals, and lipids which they contain. In France, seaweed consumption is subject to specific regulations [4]. Information about their chemical composition and its variation must be provided for them to be authorized as sea vegetables. To assess the nutritional value of seaweed used as a food product, the determination of its biochemical composition is the first step. The species used as sea vegetables are mainly red and brown algae [5]. Currently, in France, only four red seaweed species are authorized for human consumption

[4], whereas 300 red seaweeds have been identified on the Brittany coast. *Grateloupia turuturu* Yamada is an alien red seaweed species, introduced with the importation of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* in the Mediterranean Thau Lagoon [6]. It was subsequently identified in Brittany at Fort Bloqué (Ploemeur, Morbihan), and its distribution in the Atlantic now extends from the Netherlands to the Canary Islands.

The exploitation of this resource has thus become an ecological and industrial challenge. This seaweed is already used as a sea vegetable in Japan and it contains, like all red algae, R-phycoerythrin ( $3.0 \pm 0.3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ) [7], a pigment which plays a key role in photosynthesis [8]. Phycoerythrins are commonly used for various fields of applications, such as immunology, cell biology, flow cytometry, food, and cosmetics [9, 10] and have a high added value (currently up to 300 €/mg). *Grateloupia turuturu* is therefore a biomass of industrial interest. However, studies performed on other algae clearly show that their chemical composition varies according to the species, the geographic area, and the season or environmental conditions [11]. Many studies [12] have investigated not only the long-term adaptation strategies (at the cellular level) of red algae by changes in the anatomy of the thallus, in the cell wall, and differences in chloroplast morphology and thylakoid organization [13], but also the short-term adaptation at the molecular level, including alterations in pigmentation and in photosynthetic membrane composition and functionality [14]. Denis et al. [7] showed seasonal variations in the chemical composition of *G. turuturu* and its potential nutritional value.

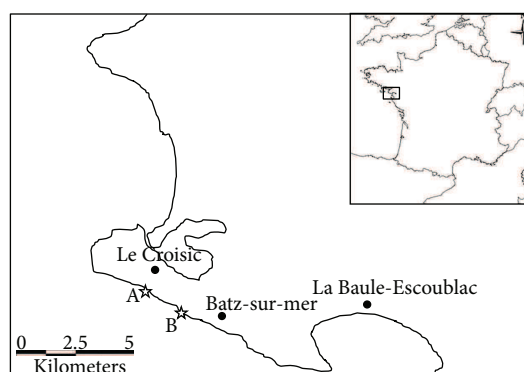
In this context, the influence of two sampling sites on the biochemical content of *G. turuturu* was studied with the objective of adding to the knowledge of the criteria which play a role in the biochemical composition of this seaweed. In addition, the effects of the sampling site and two storage methods (freezing and freeze-drying) on the extraction of R-PE were investigated.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Sampling.** The thalli of *G. turuturu* Yamada (Rhodophyta, Halymeniaceae) were collected on May 18, 2010 during the same tide at two field sites in the intertidal zone of the Atlantic Coast, France: Le Croisic ( $47^{\circ}17'53.5''\text{N}-2^{\circ}32'38.6''\text{O}$ ) (A) and Batz-sur-mer ( $47^{\circ}16'33.2''\text{N}-2^{\circ}29'39.8''\text{O}$ ) (B) (Figure 1). Epiphytes were removed and samples were rinsed successively with tap water then distilled water. Subsequently, the algae were immediately frozen.

**2.2. Storage.** For both sites (A and B), one part of the samples (1) was freeze-dried and studied. Another part of the frozen algae (2) was immediately freeze-dried and then stored for 6 months at room temperature in darkness before extraction and analysis. The last part (3) was frozen and stored for 6 months at  $-20^{\circ}\text{C}$  in darkness then freeze-dried just before analysis (Figure 2).

**2.3. Extraction of Water-Soluble Compounds.** Freeze-dried samples were ground in liquid nitrogen, and the resulting



☆ Sampling sites

FIGURE 1: Location of the two field sampling sites of *Grateloupia turuturu* along the Atlantic Coast (France).

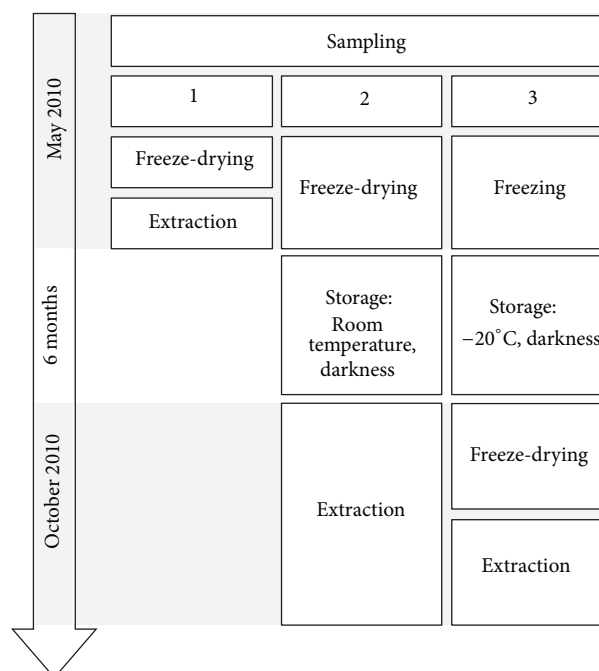


FIGURE 2: *Grateloupia turuturu*: protocol for the sampling strategy and storage mode.

powder was homogenized with sodium phosphate buffer (20 mM; pH 7.1). The extraction was performed with a 1/20 ratio ( $w/v$ ) for 20 min. This procedure and most subsequent manipulations were carried out at low temperature ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Then, the suspension was centrifuged ( $25,000 \times g$ , 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). The resulting supernatant [the aqueous crude extract (CE)] contained the water-soluble compounds. The extractions were performed in triplicate.

**2.4. R-Phycoerythrin Determination.** R-PE concentration and purity were determined spectrometrically using the classic Beer and Eshel equation (1) [15] and the  $A_{565}/A_{280}$  ratio

(=Purity Index or PI) [16–20], respectively. R-PE yield was expressed as  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  dw.

$$[\text{R} - \text{PE}] = [(A_{565} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) \times 0.20] \times 0.12. \quad (1)$$

The R-PE absorption spectra displayed three peaks: two at 495 and 545 nm and one main peak at 565 nm. The spectral profile is commonly used to indicate the nondegradation of R-PE.

**2.5. Water-Soluble Carbohydrates.** Total water-soluble carbohydrates were analyzed in the CE using the modified colorimetric phenol-sulfuric acid method [21]. Phenol at 5% (200  $\mu\text{L}$ ) was added to 200  $\mu\text{L}$  of sample solution or glucose solution followed by 1 mL of concentrated sulfuric acid. The tubes were allowed to stand for 10 min at room temperature before vortexing (10 sec at 3000 rpm), then for 15 min at room temperature and 30 min at 35°C before absorbance was measured at 490 nm. Glucose was used as a standard (range from 0 to 100 mg/L).

**2.6. Water-Soluble Proteins.** Total water-soluble proteins in the CE were analyzed by the method adapted from Bradford [22]. Bradford reagent (Sigma) (200  $\mu\text{L}$ ) was added to 800  $\mu\text{L}$  of sample solution. The absorbance measurement at 595 nm (read immediately after the reaction) and the use of BSA (Sigma) as a standard (from 0 to 50 mg/L) enabled the protein content to be determined.

**2.7. Total Nitrogen.** The organic nitrogen content was quantified by the Kjeldahl method [23], and an estimate of the total protein content was calculated by multiplying the nitrogen content by a factor of 6.25 [24].

**2.8. Ammonium Sulfate Precipitation.** The CE was salted out with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at 80% saturation at 4°C for 2 h and collected by centrifugation at 25,000  $\times\text{g}$  for 20 min at 4°C. The precipitated proteins were resuspended in sodium phosphate buffer (20 mM; pH 7.1). The protein suspension, named protein extract (PE), was collected and stored at 4°C in the dark. R-PE was also analyzed and the purification process was assessed according to the storage method.

**2.9. Lipids.** Lipids were extracted from fresh algae with a mixture of dichloromethane: methanol (2 : 1, v/v) [25]. NaCl (5%) was added to the aqueous phase to improve phase separation. The lipid content was determined by the gravimetric method.

**2.10. Ash Content.** Total ash was determined by incineration of 1 g of dry algal material in an oven at 450°C for 4 h. The ash content was expressed as a percentage of dry weight.

**2.11. Thalli Transversal Cross-Section.** In order to estimate the mean thickness of thalli, transversal cross-sections were carried out on A and B samples. Three slides of a homogenous biomass representative of each site were prepared, eight sections were chosen randomly, and five transects were made to measure the mean thickness. Photomicrographs were

made using a light microscope (Olympus AX70/provis) without staining, obtained with a digital camera (Dmx 1200F, Nikon, Japan) and analyzed using Lucia G imaging software (Laboratory Imaging, CZ).

**2.12. Statistics and Expression of Results.** All analyses were performed in triplicate. Means and standard deviations are given for each experiment. Statistical analyses were conducted using the SigmaStat software version 3.0 for Windows. One-way analyses of variance were used (ANOVA). Significant differences at  $P < 0.05$  between the samples were determined by the Student-Newman-Keuls post hoc multi-comparison test (SNK).

### 3. Results and Discussion

**3.1. Sampling Site Comparison.** Figure 3 shows the differences between the thalli from the two sampling sites in terms of thickness, viscosity, color, and appearance. Clearly, thalli samples from A (Figure 3(a)) are thicker, less viscous, and more greenish than those from B (Figure 3(b)). These observations are summarized in Table 1. Differences were visible on the biological material, since the thalli growing in A were thick and wide, of various shapes, brown, and of low viscosity, while those growing in B were long and thin, red, and very viscous. The difference in thickness was confirmed by transversal cross-section, illustrated in Figures 3(c) and 3(d). Using Lucia G imaging software, the mean thickness was determined as  $239 \pm 41 \mu\text{m}$  for A samples against  $136 \pm 17 \mu\text{m}$  for B samples. These results were thus significantly different ( $P < 0.001$ ) and confirmed the morphological differences observed between the samples from the two sites. Consequently, there seems to be a relation between the morphology of thalli and perhaps the environmental characteristics of the sampling sites. These ecological characteristics were not determined in our case so, a further study of the criteria such as salinity, hydrodynamism, and water pH will be necessary to validate this hypothesis. The differences observed could also be due to the presence of distinct genetic populations on the sites studied and, in this case, a genetic determination from each sampling will need to be performed in the future.

These differences between samples were observed during the washing step. Effectively, the samples from B gave a pink and fluffy water wash indicating a high R-PE solubility. This was not the case with the samples from A, which were also characterized by highly viscous extracts. This is the first time that this phenomenon has been reported in this species.

Regarding the biochemical composition, the total protein content ( $217.75 \pm 19.72 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) for B samples (Table 1) was close to that recorded for *G. turuturu* sampled in May 2006 ( $203.1 \pm 19.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) by Denis et al. [7] and in 1984 by Fujiwara-Arasaki et al. [26] with a  $200 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  dw protein content. However, the protein content of A samples ( $161.58 \pm 5.66 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) was lower than those previously reported values and also than that ( $220 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) described for the edible seaweed *Palmaria palmata* [27]. Denis et al. [7] found that proteins in *G. turuturu* were subject to large variations during the year with a maximal concentration



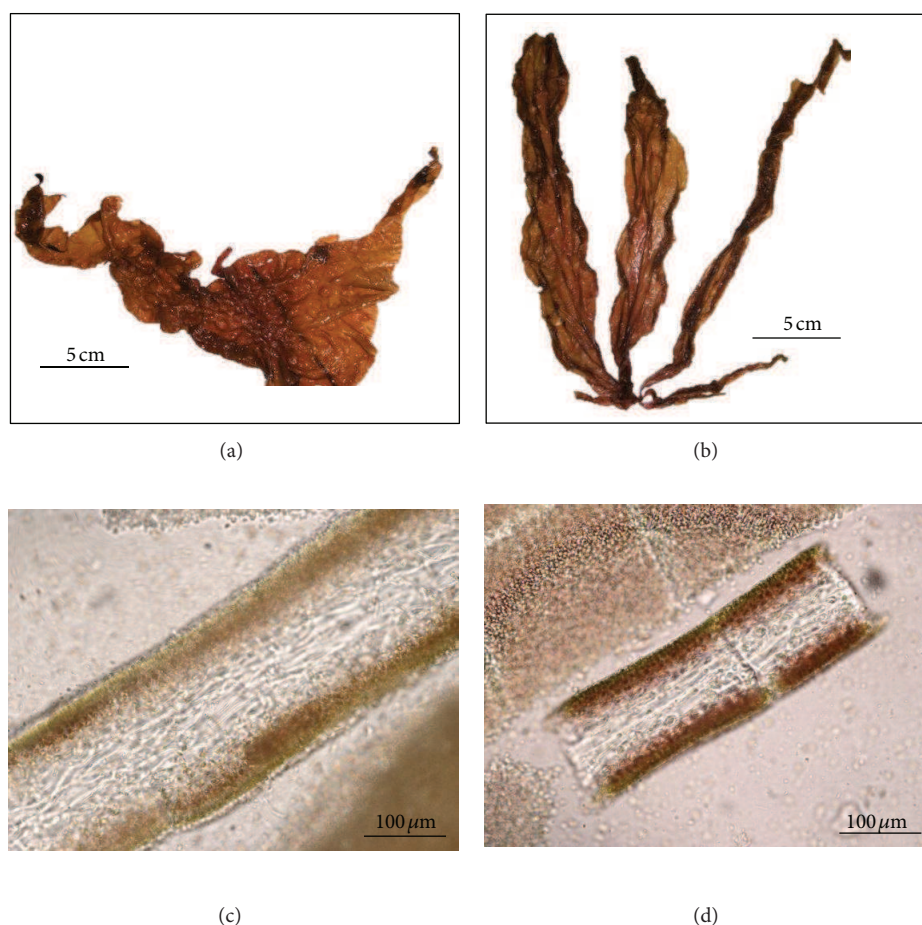


FIGURE 3: *Grateloupia turuturu* thalli collected from two different sites: A and B. (a) Morphological observation of thallus from A. (b) Morphological observation of thallus from B. (c) Transversal section of A thallus. (d) Transversal section of B thallus.

of  $300 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$  recorded in winter and a minimum of  $150 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$  during July and August. In this current study, variations in protein content according to the sampling site are reported for the first time. The water-soluble protein content of B samples ( $19.15 \pm 0.47 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ) was also significantly higher than in A samples ( $7.19 \pm 0.74 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ). Using the same extraction protocol presented here, a previous study showed that the water-soluble protein content in *G. turuturu* sampled from another site (located in Piriac sur Mer ( $47^{\circ}22'45.6''\text{N}$ -  $2^{\circ}33'15.9''\text{O}$ ), near to both sites A and B) was  $9.4 \pm 2.0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$  [28], further confirming that water-soluble protein content varies according to the sampling site and may differ according to the genetic population concerned. This last hypothesis will need to be verified by a further study about the genetic determination of *G. turuturu* populations on the Brittany coast.

Regarding the total water-soluble carbohydrates, B samples appeared to be the richest ( $41.57 \pm 0.66 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ) compared to A samples ( $16.05 \pm 0.82 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ) (Table 1). It has been previously demonstrated that the amount of water-soluble sugars in this algae is  $24.0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$  [28], in agreement with that obtained in this study. These observations

suggest that water-soluble carbohydrates (highest in B) do not prevent the extraction of soluble proteins (8.8% of total proteins extracted instead of 4.4% for samples from A) (Table 1).

The lipid content was also significantly different in these samples;  $28.07 \pm 5.12 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$  for A and  $54.35 \pm 2.05 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$  for B. While Denis et al. showed that there was no significant difference in total lipid content throughout the year, the results presented here demonstrate that there were variations between the samples from two different sampling sites. These values were higher than those recorded in *Palmaria palmata* ( $15.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ) or in *Chondrus crispus* ( $6.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ). The values obtained for the *G. turuturu* sample from A were close to those reported for another red edible seaweed, *Porphyra umbilicalis* ( $33.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ) [29].

As seen previously, the composition in proteins, water-soluble carbohydrates, and lipids varies according to the site studied.

Concerning the R-PE, the higher content was recorded for the samples collected in B (Table 1). This is consistent with the previous results about the total protein content and the best extraction of water-soluble proteins already noted for the



TABLE 1: *Grateloupia turuturu*: morphological aspects and biochemical composition of site A and B samples.

Site	A	B
Appearance of thalli	Thick, low viscosity, brown-greenish	Thin, high viscosity, brown-red
Thickness of thalli ( $\mu\text{m}$ )	$239 \pm 41^a$	$136 \pm 17^b$
% cortex	$46 \pm 8^a$	$48 \pm 9^a$
% medulla	$54 \pm 8^a$	$52 \pm 9^a$
Total protein ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw)	$161.58 \pm 5.66^a$	$217.75 \pm 19.72^b$
Water-soluble protein ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw)	$7.19 \pm 0.74^a$	$19.15 \pm 0.47^b$
R-PE ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw)	$1.16 \pm 0.33^a$	$4.39 \pm 0.15^b$
Lipid ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw)	$28.07 \pm 5.12^a$	$54.35 \pm 2.05^b$
Carbohydrates ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw)	$16.05 \pm 0.82^a$	$41.57 \pm 0.66^b$
Dry weight ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw)	$127.68 \pm 7.31^a$	$64.61 \pm 11.06^b$
Ash ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw)	$144.42 \pm 1.75^a$	$155.86 \pm 2.58^b$

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Significant differences at  $P < 0.05$  are indicated by different letters (a-b).

B samples. The differences in R-PE yield between samples A and B could also be explained by the difficulty of extracting R-PE from A samples.

The R-PE yield variation was comparable to that of total proteins, with a higher yield in sample B ( $4.39 \pm 0.15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) than in sample A (Table 1). This value was close to that reported in a previous study on R-PE from *Grateloupia turuturu* ( $3.0 \pm 0.3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) [7], but for A, the R-PE yield ( $1.16 \pm 0.33 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) was lower than in this study, in agreement with the total protein content results.

The R-PE yield and PI were significantly lower ( $115.21 \pm 0.75 \times 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  dw and  $0.22 \pm 0.00$ , resp.) in A samples than in B samples ( $408.34 \pm 4.08 \times 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  dw and  $0.76 \pm 0.01$ , resp.) (Tables 1 and 2). Moreover, for the protein extract from B samples, precipitation in 80% ammonium sulfate saturation led to a transparent supernatant and a reddish-pink pellet for which the PI increased from  $0.76 \pm 0.01$  for B1 CE to  $0.93 \pm 0.03$  for B1 PE (results significantly different). This fractionation step enabled the concentration of R-PE to be increased by a factor of about 1.22 compared to the previous case.

For all samples from A and B, the precipitation in 80% ammonium sulfate saturation led to a PI increase and a yield decrease, but this step was more difficult to achieve with B samples. The different yields and PI values between samples A and B (Table 2) and the spectral differences (Figure 4) showed that the samples studied here reacted differently to the extraction protocol, and that other parameters interfered with this protocol. This step corresponded to a prepurification step but should be adapted according to the biomass.

As noted previously, strong differences in R-PE content were observed between the sampling sites. Some hypotheses could explain these results. Effectively, several authors have already shown an increase in algal population density induced by one environmental factor: hydrodynamism [30, 31]. Plouguerné has reported that other factors, like seawater temperature and changes in salinity, are involved in the recruitment of *G. turuturu* and therefore could have an impact at a biochemical level [32]. Moreover, Denis et al. [7]

TABLE 2: Purity index (PI) and yields of crude extracts and protein extracts from samples from sites A and B and following the three storage modes.

	Fraction	
	PI ( $A_{565 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ )	R-PE yield ( $\times 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw)
A1 CE	$0.22 \pm 0.00$	$115.21 \pm 0.75$
A1 PE	$0.49 \pm 0.01$	$74.42 \pm 0.43$
A2 CE	$0.12 \pm 0.03$	$50.03 \pm 2.13$
A2 PE	$0.17 \pm 0.01$	$31.61 \pm 0.75$
A3 CE	$0.12 \pm 0.00$	$71.50 \pm 1.14$
A3 PE	$0.27 \pm 0.01$	$40.01 \pm 0.78$
B1 CE	$0.76 \pm 0.01$	$408.34 \pm 4.08$
B1 PE	$0.93 \pm 0.03$	$264.56 \pm 2.08$
B2 CE	$0.48 \pm 0.01$	$215.38 \pm 15.05$
B2 PE	$0.57 \pm 0.01$	$182.19 \pm 6.47$
B3 CE	$0.70 \pm 0.01$	$364.32 \pm 20.02$
B3 PE	$0.78 \pm 0.01$	$254.78 \pm 7.67$

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Note: samples PI values are all significantly different between them. The same is observed for R-PE yield values.

carried out a study on the seasonal variations of *G. turuturu* and suggested that the best period to harvest this species for R-PE extraction was from February to June. Seasonal variations had an impact at the biochemical level, so light and seawater temperature were two major factors influencing seaweed biochemical content. In this study, only 21% of the dry weight was evaluated for A samples, while around 40% was assessed for B samples. This means that unevaluated matter was composed essentially of fibers (insoluble sugars), which mostly entered the cell wall structure. This difference could perhaps explain the difficulty of extracting R-PE from A samples. The CE spectra (Figure 4(c)) confirmed these differences between samples from A and B. Indeed, using the same extraction protocol, the 565 nm absorbance was five times higher in B than in A.

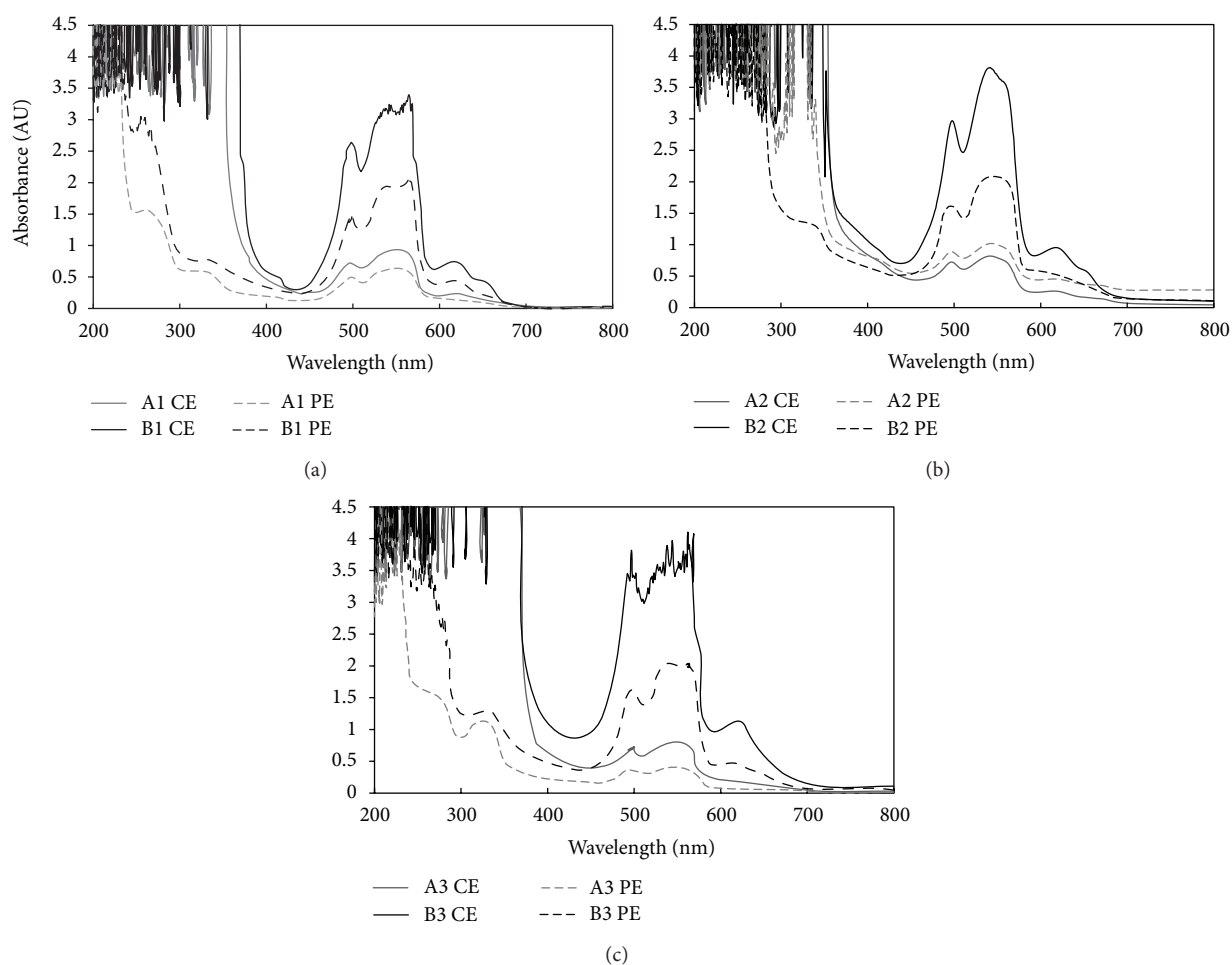


FIGURE 4: *Grateloupia turuturu*: absorbance spectra of the R-phycoerythrin crude extract (CE) and protein extract (PE). Comparison of storage methods for the three samples; (a): no storage (1), (b): storage at room temperature, darkness, 6 months (2), and (c): storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ , darkness, 6 months (3), of the two field collection sites A (the gray solid line and the gray dashed line) and B (the black solid line and the black dashed line).

**3.2. Storage Method Comparison.** To study the impact of the storage method on R-PE extraction yield and purity index, the three following methods were investigated: no storage (1), freeze-dried algae stored for 6 months at room temperature (2), and frozen algae stored for 6 months at  $-20^{\circ}\text{C}$  (3). Having demonstrated that the two sampling sites induce different R-PE extraction yields, this part of the work was carried out for both sites (Table 2).

For the two sampling sites, no storage led to the best results in terms of R-PE yield and purity. Storage method 2 had the lowest and significantly different R-PE yields ( $50.03 \pm 2.13 \times 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$  and  $215.38 \pm 15.05 \times 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ , resp.) and the lowest PI ( $0.12 \pm 0.03$  and  $0.48 \pm 0.01$ , resp.). This was confirmed by the spectra (Figure 4(b)), where the peak feature of the R-PE at 565 nm was not as marked as for other samples, reflecting a deterioration in the R-PE over time. The freezing storage method gave better results. In fact, the B3 R-PE extraction yield ( $364.32 \pm 20.02 \times 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ) was greater than and significantly different from that of B2, likewise for the B3 PI ( $0.70 \pm 0.01$ ). Thus, freezing provided

better sample preservation than freeze-dried storage at room temperature in darkness (Table 2). The preservation method and the duration seemed to have an impact on samples. For long-term preservation, based on R-PE yield and purity, the best preservation method is freezing of fresh seaweed [3]. Therefore, the sampling site and storage conditions of samples are two major factors that will affect the extraction step and thus the R-PE yield. So, in order to optimize the extraction of this pigment with high added value, it is necessary to use a standardized biomass for which the environmental parameters are known and to optimize the storage conditions to enhance the R-PE extraction.

## 4. Conclusion

Sampling site and storage method were analyzed for their effects on R-PE extraction from the edible red seaweed *G. turuturu*, harvested on the south Brittany coast (France). The originality of this study is its focus on steps that are upstream of R-PE extraction, that is, the influence of sampling site and

storage method. The aim was to show how these steps have an impact on the extraction of R-PE. By analyzing the R-PE, the study showed that both the yield and the purity of the pigment were significantly different between sampling sites. This result is interesting in an upgrading context, especially in the case of the use of this pigment as a food colorant. Moreover, it was demonstrated that the biochemical content in protein, lipid, carbohydrate, and dry matter varied between the two sites. It was the same regarding the storage method (significant differences in yield and purity of the R-PE between the two storage methods). A previous study [7] showed the effect of seasonal conditions on the variation in biochemical composition of *G. turuturu* collected in Brittany. These results add new information to that already published and highlight the importance of the sampling site environmental factors and the conditions of storage, especially to recover R-PE. The development of a cultivation strategy to produce a standardized biomass for food use is still a perspective which could be investigated.

However, further studies (e.g., temperature, light, hydrodynamism, and salinity impact on biochemical content) will be necessary to optimize the R-PE yield from *G. turuturu*. To improve our knowledge of this species, used in Asia as a food and cosmetic additive, a study is underway in our laboratory to assess R-PE stability toward light, temperature, pH, and time.

## Acknowledgments

This work was performed within the Integrated Research Project BIOTECMAR. The authors are grateful to J.P. Bergé and C. Donnay-Moreno, Ifremer, Nantes, for their help with the Kjeldahl analysis and to Carol Robins for correcting the English of this paper.

## References

- [1] M. Blanchard, P. Gouletquer, D. Hamon et al., "Liste des espèces marines introduites dans les eaux bretonnes et des espèces introduites envahissantes des eaux périphériques," 2010, <http://archimer.ifremer.fr/doc/00026/13737/>.
- [2] K. Nisizawa, H. Noda, R. Kikuchi, and T. Watanabe, "The main seaweed foods in Japan," *Hydrobiologia*, vol. 151-152, no. 1, pp. 5–29, 1987.
- [3] R. Kaas, "The seaweed resources of France," in *Seaweed Resources of the World*, I. A. T. C.M. Ohno, Ed., pp. 233–244, Japan International Cooperation Agency, Yokosuka, Japan, 1998.
- [4] S. Mabeau and J. Fleurence, "Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 4, no. 4, pp. 103–107, 1993.
- [5] C. Dawczynski, R. Schubert, and G. Jahreis, "Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products," *Food Chemistry*, vol. 103, no. 3, pp. 891–899, 2007.
- [6] W. F. Farnham, "Studies on aliens in the marine flora of Southern England," in *The Shore Environment*, J. H. Price, D. E. Irvine, and W. F. Farnham, Eds., vol. 2, pp. 875–914, Ecosystems, New York, NY, USA, 1980.
- [7] C. Denis, M. Moranchais, M. Li et al., "Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France)," *Food Chemistry*, vol. 119, no. 3, pp. 913–917, 2010.
- [8] A. N. Glazer, "Light guides: directional energy transfer in a photosynthetic antenna," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, no. 1, pp. 1–4, 1989.
- [9] A. N. Glazer, "Phycobiliproteins—a family of valuable, widely used fluorophores," *Journal of Applied Phycology*, vol. 6, no. 2, pp. 105–112, 1994.
- [10] S. Sekar and M. Chandramohan, "Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization," *Journal of Applied Phycology*, vol. 20, no. 2, pp. 113–136, 2008.
- [11] K. Ito and K. Hori, "Seaweed: chemical composition and potential food uses," *Food Reviews International*, vol. 5, pp. 101–144, 1989.
- [12] L. Talarico and G. Maranzana, "Light and adaptive responses in red macroalgae: an overview," *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, vol. 56, no. 1, pp. 1–11, 2000.
- [13] L. Talarico, "Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to light," *Scientia Marina*, vol. 60, no. 1, pp. 205–222, 1996.
- [14] M. J. Dring, A. Wagner, J. Boeskov, and K. Lüning, "Sensitivity of intertidal and subtidal red algae to UVA and UVB radiation, as monitored by chlorophyll fluorescence measurements: influence of collection depth and season, and length of irradiation," *European Journal of Phycology*, vol. 31, no. 4, pp. 293–302, 1996.
- [15] S. Beer and A. Eshel, "Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae," *Australian Journal of Marine & Freshwater Research*, vol. 36, pp. 785–792, 1985.
- [16] A. V. Galland-Irmouli, L. Pons, M. Luçon et al., "One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalgae *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis," *Journal of Chromatography B*, vol. 739, no. 1, pp. 117–123, 2000.
- [17] L. N. Liu, X. L. Chen, X. Y. Zhang, Y. Z. Zhang, and B. C. Zhou, "One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*," *Journal of Biotechnology*, vol. 116, no. 1, pp. 91–100, 2005.
- [18] R. Rossano, N. Ungaro, A. D'Ambrosio, G. M. Liuzzi, and P. Riccio, "Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata* Ellis & Solander," *Journal of Biotechnology*, vol. 101, no. 3, pp. 289–293, 2003.
- [19] L. Sun, S. Wang, X. Gong, M. Zhao, X. Fu, and L. Wang, "Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalgae *Heterosiphonia japonica*," *Protein Expression and Purification*, vol. 64, no. 2, pp. 146–154, 2009.
- [20] G. Wang, "Isolation and purification of phycoerythrin from red alga *Gracilaria verrucosa* by expanded-bed-adsorption and ion-exchange chromatography," *Chromatographia*, vol. 56, no. 7-8, pp. 509–513, 2002.
- [21] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, "Colorimetric method for determination of sugars and related substances," *Analytical Chemistry*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356, 1956.
- [22] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248–254, 1976.
- [23] G. L. Miller and E. E. Miller, "Determination of nitrogen in biological materials," *Analytical Chemistry*, vol. 20, no. 5, pp. 481–488, 1948.

- [24] S. O. Lourenço, E. Barbarino, J. C. De-Paula, L. O. D. S. Pereira, and U. M. Lanfer Marquez, "Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds," *Phycological Research*, vol. 50, no. 3, pp. 233–241, 2002.
- [25] E. G. Bligh and W. J. Dyer, "A rapid method of total lipid extraction and purification," *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, vol. 37, no. 8, pp. 911–917, 1959.
- [26] T. Fujiwara-Arasaki, N. Mino, and M. Kuroda, "The protein value in human nutrition of edible marine algae in Japan," *Hydrobiologia*, vol. 116–117, no. 1, pp. 513–516, 1984.
- [27] A. V. Galland-Irmouli, J. Fleurence, R. Lamghari et al., "Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse)," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 10, no. 6, pp. 353–359, 1999.
- [28] C. Denis, C. Ledorze, P. Jaouen, and J. Fleurence, "Comparison of different procedures for the extraction and partial purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Grateloupia turuturu*," *Botanica Marina*, vol. 52, no. 3, pp. 278–281, 2009.
- [29] J. Fleurence, G. Gutbier, S. Mabeau, and C. Leray, "Fatty acids from 11 marine macroalgae of the French Brittany coast," *Journal of Applied Phycology*, vol. 6, no. 5–6, pp. 527–532, 1994.
- [30] V. Stiger and C. E. Payri, "Spatial and seasonal variations in the biological characteristics of two invasive brown algae, *Turbina-ria ornata* (turner) j. agardh and *Sargassum mangarevense* (grunow) setchell (sargassaceae, fucales) spreading on the reefs of tahiti (french polynesia)," *Botanica Marina*, vol. 42, no. 3, pp. 295–306, 1999.
- [31] C. van den Hoek, "The possible significance of long-range dispersal for the biogeography of seaweeds," *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, vol. 41, no. 3, pp. 261–272, 1987.
- [32] E. Plouguerné, *Etude 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 [Ph.D. thesis]*, Université de Bretagne Occidentale, 2006.

## Annexe 2

Ms. Ref. No.: FOODCHEM-D-13-01700R1

Title: Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-Phycoerythrin of Grateloupia turuturu and B-Phycoerythrin of Porphyridium cruentum  
Food Chemistry

Dear Prof. Joel FLEURENCE,

I am pleased to confirm that your paper "Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-Phycoerythrin of Grateloupia turuturu and B-Phycoerythrin of Porphyridium cruentum" has been accepted for publication in Food Chemistry.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Gordon Birch  
Receiving Editor  
Food Chemistry





## Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*



Mathilde Munier<sup>a</sup>, Sébastien Jubeau<sup>b</sup>, Alva Wijaya<sup>a</sup>, Michèle Morançais<sup>a</sup>, Justine Dumay<sup>a</sup>, Luc Marchal<sup>b</sup>, Pascal Jaouen<sup>b</sup>, Joël Fleurence<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Mer Molécule Santé, EA 2160, Université de Nantes, Pôle Mer et Littoral, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 3, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Génie des Procédés Environnement Agro-alimentaire (GEPEA), UMR CNRS 6144, Université de Nantes, Pôle Mer et Littoral, 37 Boulevard de l'Université, BP 406, 44602 Saint-Nazaire Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 April 2013

Received in revised form 26 September 2013

Accepted 24 October 2013

Available online 1 November 2013

#### Keywords:

Phycoerythrins

pH stability

Temperature stability

Light stability

*Grateloupia turuturu*

*Porphyridium cruentum*

### ABSTRACT

Phycoerythrin is a major light-harvesting pigment of red algae, which could be used as a natural dye in foods. The stability of R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum* in relation to different light exposure times, pHs, and temperatures was studied. Regarding the light exposure time, after 48 h, the reduction in concentrations of B-phycoerythrin and R-phycoerythrin were  $30 \pm 2.4\%$  and  $70 \pm 1\%$ , respectively. Phycoerythrins presented good stability from pH 4 to 10. At pH 2, the reduction in concentration was  $90 \pm 4\%$  for B-phycoerythrin and  $40 \pm 2.5\%$  for R-phycoerythrin while, at pH 12, the phycoerythrins were degraded. Phycoerythrins showed good stability toward temperature, up to 40 °C. At 60 °C, the reduction in concentrations of B-phycoerythrin and R-phycoerythrin were  $50 \pm 3.4\%$  and  $70 \pm 0.18\%$ , respectively. Moreover, the best conditions of storage ( $-20$  °C) were determined.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Phycobiliproteins (PBPs) are the major light-harvesting chromoproteins present in some seaweeds, such as Rhodophytes, Cyanobacteria and Cryptophytes (Gantt, 1981; Glazer, 1984). They are commonly divided into four classes, based on their light absorption properties and types of bilins: phycoerythrins (PEs;  $\lambda_{\max} = 540$ – $570$  nm), phycocyanins (PCs;  $\lambda_{\max} = 610$ – $620$  nm), allophycocyanins (APCs;  $\lambda_{\max} = 650$ – $655$  nm) and phycoerythrocyanins (PECs;  $\lambda_{\max} = 560$ – $600$  nm) (Glazer, 1976). Phycoerythrins (PEs) have received much attention in recent years due to their spectral, fluorescent and colorant properties (Fleurence, 2003). They can be divided into four classes: R-phycoerythrin (R-PE), B-phycoerythrin (B-PE), C-phycoerythrin (C-PE) and B-phycoerythrin (B-PE), based on their origin and absorption spectrum (Bogorad, 1975; Glazer, 1976; Glazer & Hixson, 1975). Spectral differences between phycoerythrins are due to the presence of different types of bilin prosthetic groups (Gla-

zer, 1988). R-PE is the most abundant phycobiliprotein from red algae and marine unicellular cyanobacteria (Denis et al., 2010). It is composed of three polypeptide subunits, forming a complex  $[(\alpha\beta)_6\gamma]$ :  $\alpha$  (18–20 kDa),  $\beta$  (19.5–21 kDa), and  $\gamma$  (30 kDa) (Galland-Irmouli et al., 2000). B-PE, commonly found in microalgae (Gantt & Lipschultz, 1974), contains the same subunits, forming the same complex  $[(\alpha\beta)_6\gamma]$  as R-PE, but presents a different absorption spectrum.

Phycobiliproteins have gained importance in commercial sectors. There is an increasing demand and preference for natural colors which are of use in food, pharmaceuticals, cosmetics, textiles and as printing dyes. Because of their spectroscopic and biological properties, phycoerythrins are widely used in biochemical techniques and clinical diagnoses. They are especially used as a fluorescent probe in flow cytometry, microscopy, immunochemistry, and biomedical reagents (Isailovic, Sultana, Phillips, & Yeung, 2006; Sekar & Chandramohan, 2008), and also as a fluorescent dye, and in the cosmetic industry (Fleurence, 2004; Sekar & Chandramohan, 2008). The food industry could be interested in the use of a red fluorescent colorant as a complement to Phycocyanin, a blue fluorescent pigment already available from *Spirulina platensis* (Fleurence, 2004; Santiago-Santos, Ponce-Noyola, Olvera-Ramirez, Ortega-Lopez, & Canizares-Villanueva, 2004). Methods have been developed to

Abbreviations: B-PE, B-phycoerythrin; CE, crude extract; PBP, phycobiliprotein; PE, phycoerythrin; PI, purity index; R-PE, R-phycoerythrin.

\* Corresponding author. Tel.: +33 (0)2 51 12 56 60; fax: +33 (0)251 12 56 68.

E-mail address: [joel.fleurence@univ-nantes.fr](mailto:joel.fleurence@univ-nantes.fr) (J. Fleurence).



obtain pure PE from several different algae. PEs are commonly extracted in diluted phosphate buffer from algae and then precipitated by salting-out with ammonium sulfate at different percentages. After desalting by dialysis, PEs are usually purified by various techniques: expanded bed adsorption chromatography (Bermejo et al., 2003), ion-exchange chromatography (Bermejo, Alvarez-Pez, Acién, & Molina, 2002; Liu, Chen, Zhang, Zhang, & Zhou, 2005), gel filtration (Ma, Wang, Sun, & Zeng, 2003), hydroxyapatite chromatography, a combination of two chromatography modes (Bermejo, Talavera, & Alvarez-Pez, 2001; Niu, Wang, & Tseng, 2006; Rossano, Ungaro, D'Ambrosio, Liuzzi & Riccio, 2003; Sun et al., 2009) or preparative electrophoresis (Galland-Irmouli et al., 2000). During the extraction and purification procedures, it is uncertain whether the PEs remain in their natural configuration and undergo no serious structural changes in their conformations and functions.

In the present paper, the stability of PE extracts was studied in response to physical and chemical parameters, such as light, temperature and pH. Two types of phycoerythrin, R-PE of *Grateloupia turuturu* and B-PE of *Porphyridium cruentum*, were studied in order to improve the extraction and purification steps and also for future applications as a natural colorant.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Algae preparation

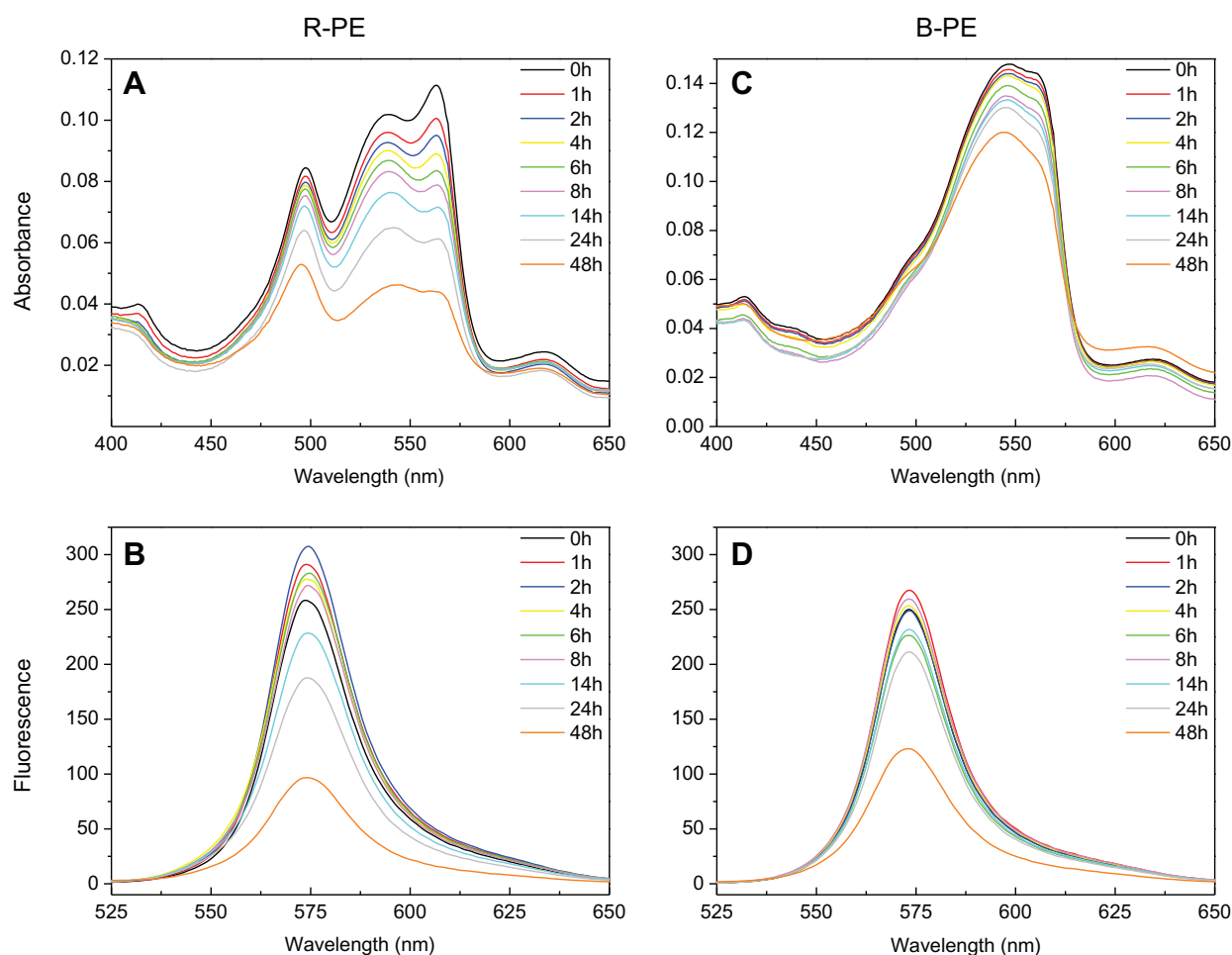
Specimens of *G. turuturu* Yamada (Rhodophyta, Halymeniaceae) were harvested in January 2011 at Batz-sur-Mer (47°16'34.82"

N-2°29'36.64"O; Atlantic Coast, France). Epiphytes were removed and algae were successively rinsed once with tap water and once with distilled water. The algae were then immediately freeze-dried.

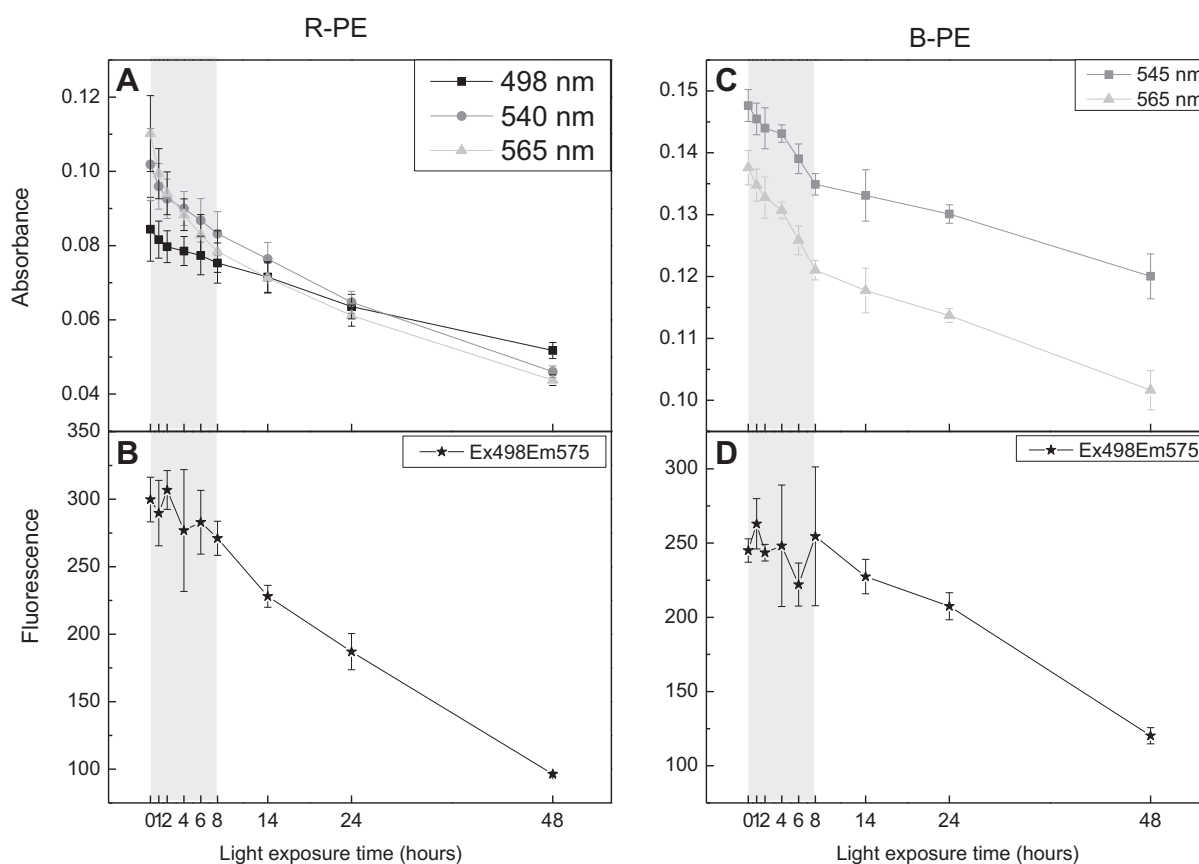
Specimens of *P. cruentum* came from the strain UTEX 161, from the University of Texas, United States of America. They were grown in a tubular *Air-Lift* PhotoBioReactor (PBR, 100 l), inoculated from a prior culture in a tubular *Air-Lift* PBR (10 l). In both cases, Hemerick culture medium was used, slightly modified to obtain a higher productivity. The biomass was harvested from the final culture by centrifugation of the cell suspension at 1500g (*RA20Vx*, *Rousselet Robotel*, Annonay, France). After a second centrifugation at 15,000g (*Sorvall RC6 plus*, *Thermo Electron Corporation*, Cergy Pontoise, France) for 10 min at 5 °C, the pellets were freeze-dried.

### 2.2. Extraction of water-soluble fraction

Freeze-dried algae were then ground in liquid nitrogen and the resulting powder was suspended in sodium phosphate buffer (20 mM; pH 7.1). The extraction was performed with a 1/20 ratio (w/v) for 20 min at 4 °C; then the suspension was centrifuged (25,000g, 20 min, 4 °C). The phycoerythrin-rich supernatant, called the crude extract (CE), was freeze-dried. The approximate chemical compositions of R-PE and B-PE extracts were 21.8% and 20.1% proteins, 5.4% and 6.5% lipids, 41.5% and 46.2% carbohydrates, 15.6% and 20% ash, 0.44% and 3.5% pigment (% dw), respectively.



**Fig. 1.** Effects of light exposure time (0–48 h) on the absorption and fluorescence emission spectra ( $\lambda_{\text{ex}} = 498 \text{ nm}$ ) of R-PE and B-PE in potassium phosphate buffer (20 mM). (A) R-PE absorption spectra; (B) R-PE fluorescence emission spectra; (C) B-PE absorption spectra; (D) B-PE fluorescence emission spectra.



**Fig. 2.** Traces of peak intensities of absorbance and fluorescence of R-PE and B-PE as a function of light exposure time. Stability range is shown by the gray area. (A) Absorbance of R-PE at 498, 540 and 565 nm; (B) fluorescence of R-PE at Ex 498 nm and Em 575 nm; (C) absorbance of B-PE at 545 and 565 nm; (D) fluorescence of B-PE at Ex 498 nm and Em 575 nm.

### 2.3. Study of stability of phycoerythrins

Experiments were conducted using the same procedures for the two phycoerythrins. CEs were solubilised in sodium phosphate buffer (20 mM, pH 7.1) to a final concentration of 0.01 mg/ml.

#### 2.3.1. Stability toward light

CEs at pH 7.1 were exposed to light at 4 °C with an intensity of  $33.57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (L11-1000 Data Logger) for different times: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 14, 24 and 48 h.

#### 2.3.2. Stability toward pH

CEs were solubilised in sodium phosphate buffer at different pHs, ranging from 2 to 12. These experiments were conducted at 4 °C in darkness.

#### 2.3.3. Stability toward temperature

CEs at pH 7.1 were heated in a water bath for 1 h at different temperatures: 4, 20, 40, 60 and 100 °C. These experiments were conducted in darkness.

CEs at pH 7.1 were stored at 4 °C and –20 °C in darkness for different times: 0, 6, 24 and 48 h, 1 and 2 weeks.

### 2.4. Analysis

For each sample, color changes were observed. Absorption and fluorescence emission spectra were measured and PE concentrations and purity indices (PI) were determined.

Absorption spectra were monitored from 400 to 650 nm, using a UV/Vis spectrophotometer (UVIKON-xs) while fluorescence emission spectra were monitored using an FP fluorescence spectrofluorometer (PerkinElmer LS55) with an excitation wavelength of 498 nm.

R-PE concentrations and purity were determined spectrometrically, using the Beer and Eshel Eq. (1) (Beer & Eshel, 1985) and the  $A_{565}/A_{280}$  ratio = (purity index or PI) (Galland-Irmouli et al., 2000; Liu et al., 2005), respectively. R-PE concentration was expressed as % of dry weight (dw).

$$[\text{R-PE}] = [(A_{565} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) \times 0.20] \times 0.12 \quad (1)$$

B-PE concentrations and purity were determined using the (Bermejo, Alvarez-Pez, Ación, & Molina, 2002) and the  $A_{545}/A_{280}$  ratio = (purity index or PI) (Bermejo, Alvarez-Pez, Ación, & Molina, 2002; Bermejo et al., 2003; Ma et al., 2003), respectively. B-PE concentration was expressed as % of dry weight (dw).

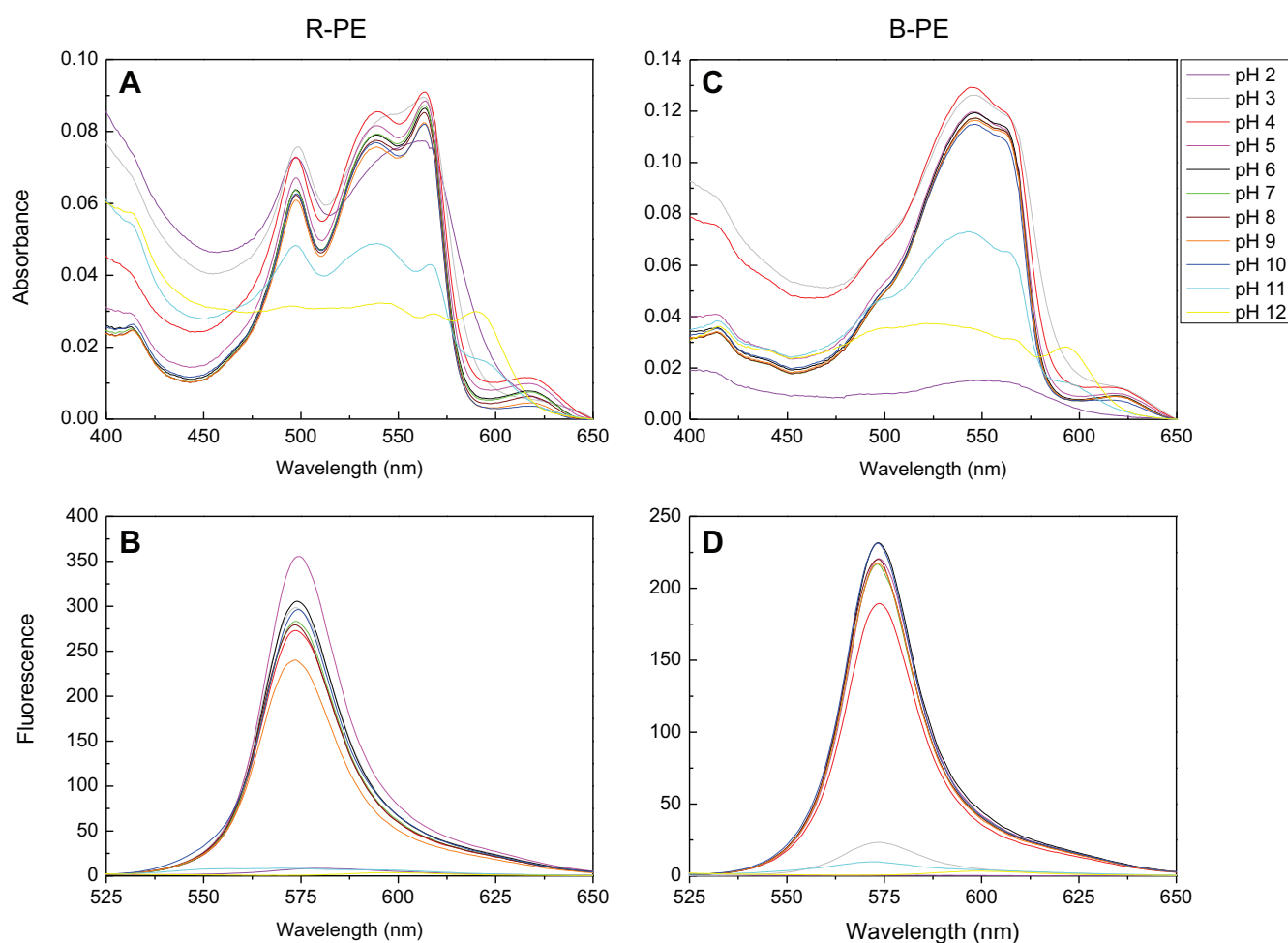
$$[\text{B-PE}] = (A_{565} - 2.8 \times [\text{R-PC}] - 1.34 \times [\text{APC}]) / 12.7$$

$$[\text{R-PC}] = (A_{620} - 0.7 \times A_{650}) / 7.38$$

$$[\text{APC}] = (A_{650} - 0.19 \times A_{620}) / 5.65$$

### 2.5. Statistical analysis

All analyses were performed in triplicate. Mean and standard deviations were calculated for each experiment. Statistical



**Fig. 3.** Effects of pH on the absorption and fluorescence emission spectra ( $\lambda_{\text{ex}} = 498 \text{ nm}$ ) of R-PE and B-PE in potassium phosphate buffer (20 mM). (A) R-PE absorption spectra at pH 2–12; (B) R-PE fluorescence emission spectra at pH 2–12; (C) B-PE absorption spectra at pH 2–12; (D) B-PE fluorescence emission spectra at pH 2–12.

analyses were conducted with the Sigma Stat 3.0 version software for Windows. One-way analyses of variance were used (ANOVA). Significant difference at  $p < 0.05$  between the samples was determined by the Student-Newman-Keul's *post hoc* multicomparison test (SNK).

### 3. Results and discussion

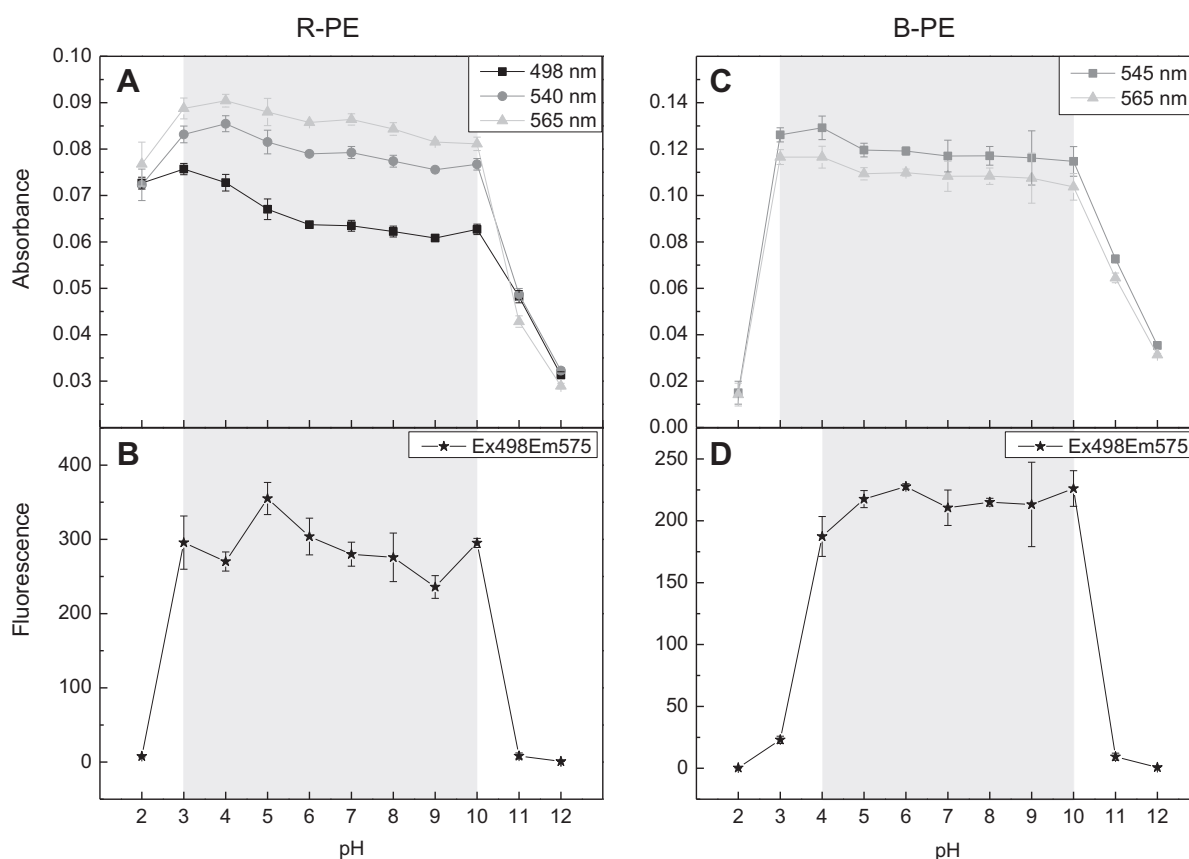
#### 3.1. Phycoerythrin stability toward light

Absorption and fluorescence spectra of R-PE (Fig. 1A and B) and B-PE (Fig. 1C and D) are presented. The absorption spectrum at pH 7.1 and 4 °C of R-PE (Fig. 1A) of *G. turuturu* was typical for PEs that contain PUB and PEB. The spectrum of R-PE (Fig. 1A) displayed three maxima: at 498 nm, corresponding to PUB, at 540 and at 565 nm, which are attributed to PEB. The fluorescence spectrum of R-PE (Fig. 1B) showed a very intense emission at 575 nm. B-PE of *P. cruentum* had slightly different spectral properties. It absorbed strongly at about 545 nm, exhibited only a slight shoulder at 495 nm (Fig. 1C) and emitted strongly at 575 nm (Fig. 1D). Purity indices were 0.41 for R-PE and 0.30 for B-PE.

In relation to the reference spectrum (0 h), successive reductions in absorption and in fluorescence were observed as the light exposure time increased. For R-PE (Fig. 1A), the peaks at 565 and 540 nm decreased slightly more than those at 498 nm, but all

peaks fell a little when exposure time increased. After 48 h, the absorbances at 540 and 565 nm decreased by 55% and 60%, respectively, and that at 498 nm by only 39% ( $p < 0.05$ ). The stronger stability of PUB was most likely due to the double binding of rings C and D in PUB to  $\beta 50$  and  $\beta 61$  Cys residues, respectively, whereas PEB was bound to the protein through one Cys residue (Liu et al., 2009). The same observation was made on emission spectra (Fig. 1B) where a decrease of 68% was measured after 48 h. For B-PE, absorption and fluorescence spectra (Fig. 1C and D) also showed a reduction in intensity during exposure to light. After 48 h, a decrease in absorbance to 19% and 26% at 545 and 565 nm was observed and 51% for fluorescence. Moreover, after 48 h, the solution was colorless and the reductions in concentration of R-PE and B-PE were  $70 \pm 1\%$  and  $30 \pm 2.4\%$ , respectively.

In Fig. 2, the absorbances at 498, 540 and 565 nm for R-PE (Fig. 2A), absorbances at 545 and 565 nm for B-PE (Fig. 2C), the fluorescence emission at 575 nm for R-PE (Fig. 2B) and for B-PE (Fig. 2D) are all represented as a function of light exposure time. The gray area represents values that were not statistically different ( $p < 0.05$ ). The results show that R-PE and B-PE presented the same time of absorbance and fluorescence stability. They were stable for up to 8 h of exposure to light. Similar results have already been reported for R-PE of *Palmaria palmata* by Galland-Irmouli (1999). They observed a reduction of half of the absorbance intensity after 6 h of exposure to light. After 24 h, the solution was colorless and the absorption spectrum was strongly modified. Moreover, they



**Fig. 4.** Traces of peak intensities of absorbance and fluorescence of R-PE and B-PE depending on pH. Stability range is shown by the gray area. (A) Absorbance of R-PE at 498, 540 and 565 nm; (B) fluorescence of R-PE at Ex 498 nm and Em 575 nm; (C) absorbance of B-PE at 545 and 565 nm; (D) fluorescence of B-PE at Ex 498 nm and Em 575 nm.

showed that sensitivity to light increased with lower pigment concentration. Rossano, Ungaro, D'Ambrosio, Liuzzi, and Riccio (2003) reported that, when exposed to light, R-PE of *Corallina elongata* showed a greater tendency to lose its chromophore and the effect of light was even greater after 15 days.

### 3.2. Phycoerythrin stability toward pH

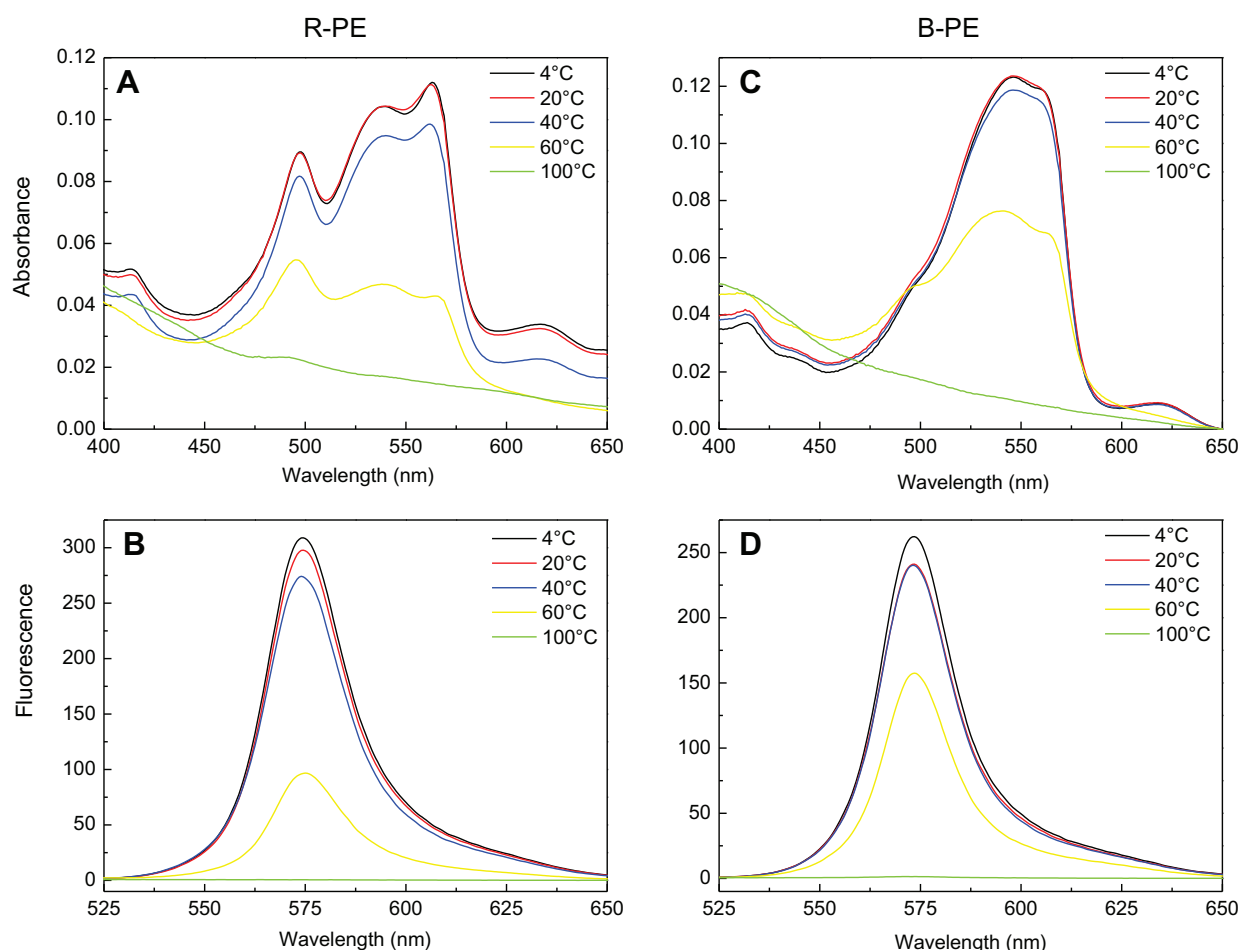
No color change in phycoerythrins, for both B-PE and R-PE, was observed at pH ranging from 4 to 10. At pH 2 and 3, the solutions of R-PE were purplish while precipitation was observed in B-PE samples. At pH 11 and 12, the intensity decreased until the solutions became colorless.

Fig. 3 represents the absorption spectra as a function of pH, between pH 2 and 12, for R-PE (Fig. 3A) and B-PE (Fig. 3C). At acidic pH, no significant differences ( $p < 0.05$ ) in spectra or in PE concentration were observed between pH 4 and 7 for both R-PE and B-PE. However, in extremely acidic buffers (pH 2 and 3), the absorption spectra of R-PE (Fig. 3A) and B-PE (Fig. 3C) were affected. At pH 2, the peaks disappeared at 545 and 565 nm for R-PE and at 495 nm for B-PE. At pH 3, the spectrum of R-PE was distorted. At alkaline pH, phycoerythrin concentration was stable in the pH range 7–10. At pH 11, large decreases in absorbance intensity were observed for B-PE and for R-PE while, at pH 12, the spectra of both R-PE and B-PE were distorted due to precipitation and denaturation of the protein.

Changes in R-PE and B-PE fluorescence spectra in response to pH are displayed in Fig. 3B and D, respectively. The fluorescence emission at 575 nm decreased beyond the pH range 4–10. For both

R-PE and B-PE, at pH 2 and 11 the fluorescence decreased by 97% and at pH 12 there was no fluorescence.

Fig. 4 summarises these observations by representing the absorbance at 498, 540 and 565 nm (Fig. 4A) and the fluorescence (Fig. 4B) of R-PE, the absorbance at 498 and 545 nm (Fig. 4C) and the fluorescence (Fig. 4D) of B-PE in relation to pH. The PEs presented a broad range (pH 3–10 for R-PE and pH 4–10 for B-PE) of absorbance and fluorescence stability (no statistical differences, represented by the gray area) whereas, under very extreme conditions (pH 2, 11 and 12 for R-PE and pH 2, 3, 11 and 12 for B-PE), absorbance and fluorescence were greatly modified. This suggests that the protein has a stable energy transfer ability at pH ranging from 3 to 10 for R-PE and from 4 to 10 for B-PE. Similar results of stability toward pH have been reported for other PEs. R-PE of *P. palmata* (Galland-Irmouli et al., 2000) and R-PE of *Polysiphonia urceolata* (Liu et al., 2009) showed good stability in the pH range 3.5–9.5. R-PE of *Porphyra yezoensis* (Orta-Ramirez, Merrill, & Smith, 2000) and R-PE of *Nori Porphyra* sp. (Ogawa et al., 1991) were stable between pH 5 and 9. R-PE of *C. elongata* was very stable at pHs in the range 6.0–8.5 (Rossano, Ungaro, D'Ambrosio, Liuzzi, & Riccio, 2003). The spectral properties of PBPs are highly pH-dependent (Bogorad, 1975). Large changes in pH (extreme) may result in the disturbance of electrostatic properties and hydrogen bonds involved in protein association that can induce changes in chromophore structure (Claire, 1992). Liu et al. (2009) mentioned that very low pH levels may cause denaturation of PBPs, including dissociation of trimers to monomers, dissociation of monomers to individual subunits and partial unfolding of subunits, whereas, in the pH range 3.5–10, the aggregation state was maintained. Ogawa et al. (1991) showed that pH induced modification of the protein



**Fig. 5.** Effects of temperature (4, 20, 40, 60 and 100 °C) on the absorption and fluorescence emission spectra ( $\lambda_{\text{ex}} = 498$  nm) of R-PE and B-PE in potassium phosphate buffer (20 mM). (A) R-PE absorption spectra; (B) R-PE fluorescence spectra; (C) B-PE absorption spectra; (D) B-PE fluorescence spectra.

conformation; in acidic solutions, near the pI, R-PE was in an aggregated form whereas, in neutral conditions, it was in a globular or compacted form before becoming partially unfolded at pH above 9.0.

### 3.3. Phycoerythrin stability toward temperature

As depicted in Fig. 5, the R-PE absorption spectrum (Fig. 5A) and fluorescence spectrum (Fig. 5B), the B-PE absorption spectrum (Fig. 5C) and fluorescence spectrum (Fig. 5D) gave the same results: no significant modification of absorbance or fluorescence was observed up to 40 °C, with a decrease in the intensity at 60 °C and no spectra at 100 °C. For R-PE, the absorbances at 540 and 565 nm decreased by 49% and 57%, respectively and, at 498 nm, by only 25% showing a better stability of PUB than PEB. Fluorescence intensity decreased by 69%. B-PE seemed more stable toward temperature: absorbance and fluorescence intensities decreased by only 40% and 34%, respectively, at 60 °C. At 60 °C, there was a reduction in concentration to  $50 \pm 3.4\%$  for B-PE and  $70 \pm 0.18\%$  for R-PE.

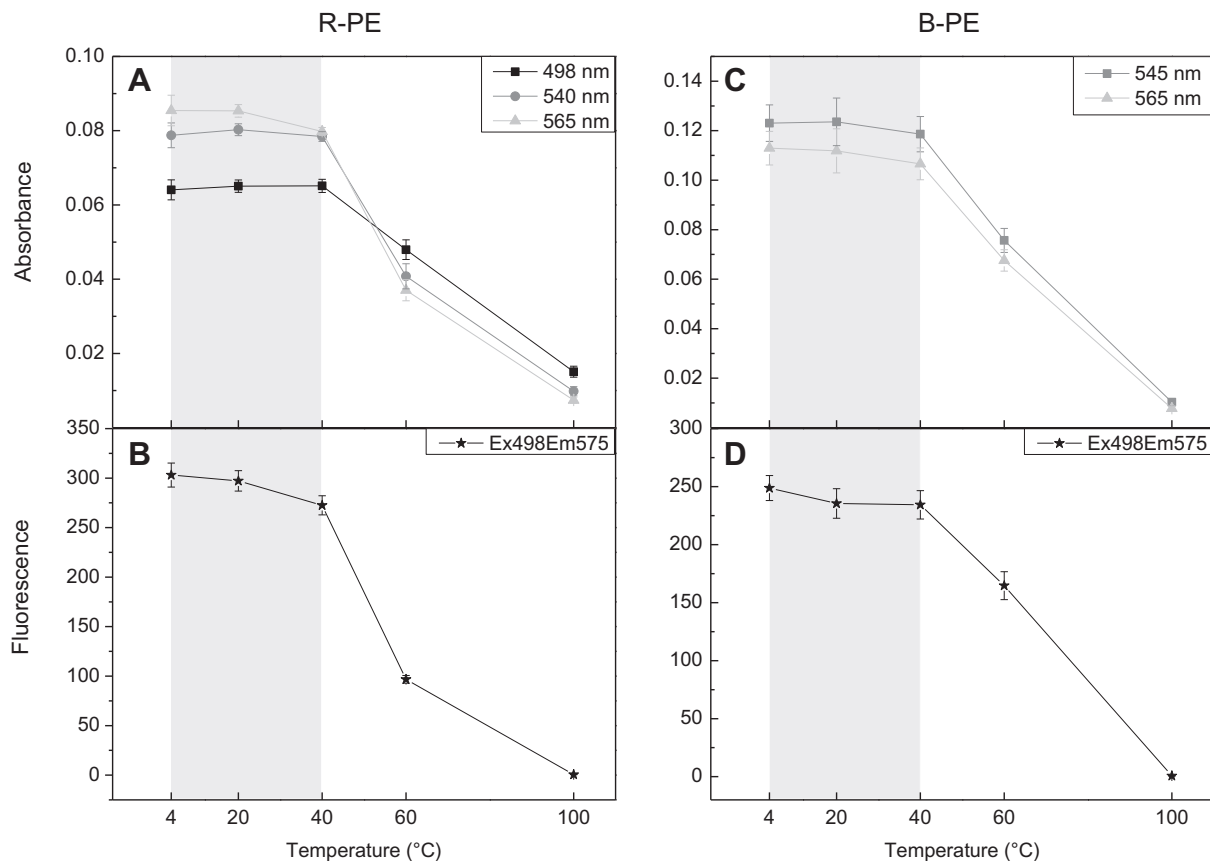
Fig. 6 summarises these observations by representing the absorbances, at 498, 540 and 565 nm for R-PE (Fig. 6A), the absorbances, at 545 and 565 nm for B-PE (Fig. 6C) and the fluorescence emission at 575 nm (Fig. 6B and D) for R-PE and B-PE, respectively, depending on the temperature. Both PEs were stable up to 40 °C (no statistical differences, represented by the gray area,  $p < 0.05$ ). These

results are consistent with the thermal stability of other PEs. D'Agnolo, Murano, Rizzo & Paoletti (1993) showed that the visible spectrum of R-PE of *Gracilaria longa* was dramatically modified by temperature, though no changes were visible until the temperature reached 45–50 °C. They specified that, among the three absorption maxima of R-PE, only the 495 nm peak showed stability toward high temperature. They concluded that there was a decrease in the amount of alpha helix, along with the increase in temperature, causing a loss of pigment stability. The same results were obtained by Galland-Irmouli et al. (2000) concerning the R-PE of *Palmaria palmate*, which displayed a good stability up to 60 °C. The 495 nm peak also showed a great stability toward high temperature.

### 3.4. Phycoerythrin stability toward storage time

To determine how long PE extracts can be stored before pigment degradation becomes evident, the stability of PEs during storage at  $-20$  °C and at 4 °C in darkness was studied. Storage at 4 and  $-20$  °C is the conventional method recommended to preserve pure PE (Sigma) and pigment samples. The absorption spectra of R-PE and B-PE after 2 weeks (336 h) of storage at  $-20$  °C were slightly modified compared to those at 4 °C which were completely distorted. This was confirmed by changes in absorbance at 498, 540 and 565 nm for R-PE and at 545 and 565 nm for B-PE: at 4 °C, phycoerythrins were stable up to 48 h whereas, at  $-20$  °C, the





**Fig. 6.** Traces of peak intensities of absorbance and fluorescence of R-PE and B-PE as a function of temperature. Stability range is shown by the gray area. (A) Absorbance of R-PE at 498, 540 and 565 nm; (B) fluorescence of R-PE at Ex 498 nm and Em 575 nm; (C) absorbance of B-PE at 545 and 565 nm; (D) fluorescence of B-PE at Ex 498 nm and Em 575 nm.

absorbance properties after 2 weeks (336 h) were the same as at 0 h. The same results were obtained for fluorescence. These results differ from those of Rossano, Ungaro, D'Ambrosio, Liuzzi and Riccio (2003) for the R-PE of *C. elongata* who reported that, after 35 days, the samples stored in the dark showed the greatest stability at 4 °C and the worst at –20 °C. However, Lawrenz, Fedewa, and Richardson (2011) mentioned that freezing samples at –80 °C resulted in no significant pigment degradation over the course of 6 months.

#### 4. Conclusion

In this present work, we studied the stability of two PEs in relation to different light exposure times, pHs and temperatures: R-PE, provided by most red algae (Rhodophyta), and B-PE, obtained from Bangiales, which are a particular family of the Rhodophyta class. We showed that the PEs were stable for up to 8 h of exposure to light, at pH ranging from 4 to 10 and at a temperature lower than 40 °C. In addition, we showed that the best conditions for storage were at –20 °C. These results may suggest the best storage for pigment preservation and the best conditions for the extraction and purification of phycoerythrins in order to preserve their functional structure. Experiments must be conducted in darkness, at pH ranging from 4 to 10 and at a temperature lower than 40 °C. Moreover, the influence of chemical (pH) and physical (temperature, light) parameters on pigment stability is important for their use in food applications. These parameters could induce changes in spectral properties, which are due to changes in protein conformation, resulting in denaturation.

#### References

- Beer, S., & Eshel, A. (1985). Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 36, 785–792.
- Bermejo, R., Acien, F. G., Ibanez, M. J., Fernandez, J. M., Molina, E., & Alvarez-Pez, J. M. (2003). Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 790, 317–325.
- Bermejo, R., Alvarez-Pez, J. M., Acien, F. G., & Molina, E. (2002). Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, 93, 73–85.
- Bermejo, R., Talavera, E. M., & Alvarez-Pez, J. M. (2001). Chromatographic purification and characterisation of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* semipreparative high-performance liquid chromatographic separation and characterisation of its subunits. *Journal of Chromatography A*, 917, 135–145.
- Bogorad, L. (1975). Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. *Annual Review of Plant Physiology*, 26, 369–401.
- Claire, C. (1992). De la création d'une banque de données sur la composition biochimique des algues aux résultats d'une investigation systématique: un colorant naturel stable issu d'une Rhodophycée. PhD Thesis, Université de Nantes, Nantes.
- D'Agnolo, E., Murano, E., Rizzo, R., & Paoletti, S. (1993). A biliprotein from the red alga *Gracilaria longa*: Thermal stability of R-phycoerythrin. *Italian Journal of Biochemistry*, 42, 316–318.
- Denis, C., Morançaïs, M., Li, M., Deniaud, E., Gaudin, P., Wielgosz-Colin, G., et al. (2010). Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France). *Food Chemistry*, 119, 913–917.
- Fleurence, J. (2003). R-phycoerythrin from red macroalgae: Strategies for extraction and potential application in biotechnology. *Applied Biotechnology, Food Science and Policy*, 1, 63–68.
- Fleurence, J. (2004). Seaweed proteins. In R. Y. Yada (Ed.), *Proteins in food processing* (pp. 197–213). Cambridge, New-York: Woodhead Publishing Limited, CRC Press LLC.
- Galland-Irmouli, A.-V. (1999). Etude des propriétés allergiques et nutritionnelles de protéines d'origine marine, PhD Thesis, Université de Nantes, France.

- Galland-Irmouli, A.-V., Pons, L., Luçon, M., Villaume, C., Mrabet, N. T., Guéant, J.-L., et al. (2000). One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 739, 117–123.
- Gantt, E. (1981). Phycobilisomes. *Annual Review of Plant Physiology*, 32, 327–347.
- Gantt, E., & Lipschultz, C. A. (1974). Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*. Pigment analysis. *Biochemistry*, 13(14), 2960–2966.
- Glazer, A. N. (1976). Phycocyanins: Structure and function. *Photochemical and Photobiological Reviews*, 1, 71–115.
- Glazer, A. N. (1984). Phycobilisome: A macromolecular complex optimised for light energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 768, 29–51.
- Glazer, A. N. (1988). Phycobiliproteins. *Methods in Enzymology*, 167, 291–303 [31].
- Glazer, A. N., & Hixson, C. S. (1975). Characterisation of R-phycocyanin. Chromophore content of R-phycocyanin and C-phycoerythrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(14), 5487–5495.
- Isailovic, D., Sultana, I., Phillips, G. J., & Yeung, E. S. (2006). Formation of fluorescent proteins by the attachment of phycoerythrobilin to R-phycoerythrin alpha and beta apo-subunits. *Analytical Biochemistry*, 358(1), 38–50.
- Lawrenz, E., Fedewa, E. J., & Richardson, T. I. (2011). Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. *Journal of Applied Phycology*, 23, 865–871.
- Liu, L.-N., Chen, X.-L., Zhang, X.-Y., Zhang, Y.-Z., & Zhou, B.-C. (2005). One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. *Journal of Biotechnology*, 116, 91–100.
- Liu, L.-N., Su, H.-N., Yan, S.-G., Shao, S.-M., Xie, B.-B., Chen, X.-L., et al. (2009). Probing the pH sensitivity of R-phycoerythrin: Investigations of active conformational and functional variation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1787(7), 939–946.
- Ma, S.-Y., Wang, G.-C., Sun, H.-B., & Zeng, C.-K. (2003). Characterisation of the artificially covalent conjugate of B-phycoerythrin and R-phycocyanin and the phycobilisome from *Porphyridium cruentum*. *Plant Science*, 164(2), 253–257.
- Niu, J.-F., Wang, G.-C., & Tseng, C.-K. (2006). Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Polysiphonia urceolata* Grev. *Protein Expression and Purification*, 49, 23–31.
- Ogawa, H., Mizuno, H., Saito, T., Yamada, Y., Oohusa, T., & Iso, N. (1991). Effects of pH on the conformation of phycoerythrin from Nori *Porphyra* sp. *Nippon Suisan Gakkaishii*, 57(5), 899–903.
- Orta-Ramirez, A., Merrill, J. E., & Smith, D. M. (2000). pH Affects the thermal inactivation parameters of R-phycoerythrin from *Porphyra yezoensis*. *Journal of Food Science*, 65(6), 1046–1050.
- Rossano, R., Ungaro, N., D'Ambrosio, A., Liuzzi, G. M., & Riccio, P. (2003). Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata* Ellis & Solander. *Journal of Biotechnology*, 101, 289–293.
- Santiago-Santos, M. C., Ponce-Noyola, T., Olvera-Ramirez, R., Ortega-Lopez, J., & Canizares-Villanueva, R. O. (2004). Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. *Process Biochemistry*, 39(12), 2047–2052.
- Sekar, S., & Chandramohan, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 20(2), 113–136.
- Sun, L., Wang, S., Gong, X., Zhao, M., Fu, X., & Wang, L. (2009). Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. *Protein Expression and Purification*, 64, 146–154.



## Annexe 3

What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture ?

Trends in Food Science & Technology

Référence :

Fleurence J., Morançais M., Dumay J., Decottignies P., Turpin V., Munier M., Garcia-Bueno N. et Jaouen P. (2012). "What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?" Trends in Food Science & Technology **27**Parlement Européen et Conseil du 16 Décembre 2008 : 57-61.



# What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?

Joël Fleurence\*,  
Michèle Morançais,  
Justine Dumay,  
Priscilla Decottignies,  
Vincent Turpin,  
Mathilde Munier,  
Nuria Garcia-Bueno and  
Pascal Jaouen

Mer Molécule Santé, EA 2160, Université de Nantes,  
Pôle Mer et Littoral, 2 rue de la Houssinière, BP 92208,  
44322 Nantes Cedex 3, France (Tel.: +33 2 51 12 56  
50; fax: +33 2 51 12 56 68; e-mail: joel.fleurence@  
univ-nantes.fr)

Seaweeds are traditionally used as sea vegetables in Asian countries but their consumption by western consumers is minimal. The nutritional value of algae and their potential use as functional ingredients in foods is discussed. The addition of seaweeds to the diet of marine animals produced by aquaculture is suggested. This would be a new opportunity to

introduce seaweeds indirectly into the human food chain in western countries, especially in Europe. The treatment of wastewater produced by aquaculture facilities with macroalgae is an additional argument for the use of this marine resource in food production and the development of a new method for marine aquaculture.

## Introduction

At least 145 species of macroalgae are used worldwide as food (Zemke-White & Ohno, 1999). Seaweeds are traditionally consumed in Asian countries as sea vegetables (Table 1). The famous hoshi-nori, prepared from red seaweeds belonging to the species *Porphyra tenera* or *Porphyra yezoensis*, is characterized by its richness in proteins (up to 47% of dry weight) and its specific taste is much appreciated by Japanese consumers (Nisizawa, Noda, Kikuchi, & Watanabe, 1987). The brown seaweeds *Undaria pinnatifida* and *Laminaria japonica*, known under the names of Wakame and Kombu, respectively, are also used as everyday foods by Japanese people. These two species are mainly produced by aquaculture in China, Korea and Japan (Table 1) and are used for food applications (sea vegetables or phycocolloid production).

In contrast, compared to Japan, macroalgae are rarely consumed in Europe. The edible seaweed consumption in Europe is close to 70 tonnes (dry products) versus 97,000 tonnes in Japan (Darcy-Vrillon, 1993). In France, the only European country which has established a specific regulation for the use of seaweeds as vegetables (Table 2) or ingredients (Mabeau & Fleurence, 1993), the consumption is estimated at 27 tonnes of dry products per year. In this particular context, what are the advantages and the prospects for using seaweeds as food in human or marine animal nutrition?

## Nutritional value of seaweeds

The nutritional value of seaweeds differs according to the species and the family considered. For example, the red seaweeds contain a high level of proteins (Fleurence, 1999; Fujiwara-Arasaki, Mino, & Kuroda, 1984) (47% of dry weight for *P. yezoensis* and 35% for *Palmaria palmata*) (Table 3) while the green seaweeds, such as *Ulva lactuca* (sea lettuce), show a lower protein level (10–25% of dry weight) and brown algae, such as *L. japonica*, have the lowest protein content (5–12% of dry weight). According to

\* Corresponding author.

Seaweed genus	Aquaculture production (tonnes in dry weight)	Sea vegetable products
<i>Laminaria</i> sp <sup>a</sup>	682,581	Kombu
<i>Porphyra</i> sp	130,614	Nori
<i>Undaria</i> sp	101,708	Wakame
<i>Gracilaria</i> sp <sup>a</sup>	50,165	Ogo-nori

<sup>a</sup> Production including phycocolloids and sea vegetables.

these data, the red seaweeds seem to be the most suitable source of proteins for human nutrition. These species, especially *P. palmata* (dulse) are described as containing a high concentration of methionine, up to 4.5 g amino acid/100 g of protein. However, other species belonging to the brown seaweeds (e.g. *Laminaria digitata*, *U. pinnatifida*) show a lower concentration in this amino acid, with 1.6 g amino acid/100 g of protein (Fleurence, 2004).

Unfortunately, seaweeds also contain polysaccharides (e.g. xylans, agar, carrageenan or alginates) which are a type of anti-nutritional factor limiting the digestibility of protein fractions (Horie, Sugase, & Horie, 1995).

However, an initial treatment of algae by enzymatic digestion with appropriate polysaccharidases or micro-organisms can significantly improve the *in vitro* digestibility of proteins from red seaweed such as *P. palmata* (Fleurence, 2004; Marion, Schwertz, Fleurence, Guéant, & Villaume, 2003). In addition, the red seaweeds are known to possess a red protein pigment called R-phycoerythrin (RPE) which is sometimes present at a high level (12% of dry weight). The RPE content follows the change in protein content, which is subject to marked seasonal variations (11.9–26% of dry weight) (Denis *et al.*, 2010; Galland-Irmouli *et al.*, 1999). This pigment is already used in Asia as a food colourant (data unpublished).

As well as proteins, seaweeds are well known to contain a high proportion of polysaccharides (30–71% of dry weight) (Darcy-Vrillon, 1993; Jensen, 1993) which are considered food fibres for human consumption. The levels of

dietary fibre are up to 49.8% of dry weight for a red seaweed such as *Porphyra* sp (Nori) and up to 62% of dry weight for the brown seaweed *Hizikia fusiforme* (Hiziki) (Dawczynski, Schubert, & Jahreis, 2007). In contrast, the edible seaweeds are characterized by low levels of lipids, generally between 1.5 and 3.3% of dry weight (Fleurence, Gutbier, Mabeau, & Leray, 1994). For the red alga *Grateloupia turuturu*, consumed in Japan as a sea vegetable, the lipid content shows little variation (2.31–2.86% of dry weight) according to the season. This species is also characterized by a high level of eicosa-pentaenoic acid (up to 24% of the total fatty acid fraction) (Denis *et al.*, 2010).

Some macroalgae also possess high levels of mineral elements which have nutritional value such as calcium and magnesium. This is true for green algae (*Ulva* sp) which have been found to contain up to 3.25 g of calcium per kg of dry weight (MacArtain, Gill, Brooks, Campbell, & Rowland, 2007). The brown seaweeds, especially the species *Laminaria digitata*, is rich in iodine (up to 10 g per kg of dry weight) (data unpublished, CEVA). However, this high iodine concentration led to a prohibition in France in 1990 against the human consumption of this species. Although it is now permitted, the final concentration in the *Laminaria* product must be below 500 mg per kg of dry weight.

Given this information, it is difficult to understand the lack of development in the use of seaweeds as food products in western countries.

One explanation of this situation could be the absence of a cooking tradition for the use of algae as sea vegetables in USA, Canada and Europe.

So what are the prospects for using seaweed in human and animal nutrition in these countries?

As well as their nutritional value (rich in fibres and proteins, mineral content), algae are rarely implicated in allergy risks compared to other marine food products (e.g. fish). Only one example of anaphylactic shock has been described after the consumption of ogo-nori (Noguchi *et al.*, 1994). In this context, seaweeds could thus be used to substitute some products for allergenic subjects. Another way to optimize the use of seaweeds in the human diet could be the introduction of this resource as functional components in food processing. For example, extracts enriched in R-phycoerythrin (RPE), a red pigment obtained from red algae, could be processed as a food colourant. A process using a membrane ultrafiltration methodology has been piloted. The aim of the project was to determine whether a concentrated RPE from the species *G. turuturu* could be obtained in economically satisfactory conditions (1 euro/L) (Denis, Masse, Fleurence, & Jaouen, 2010).

In conclusion, algae possess a nutritional value as a source of proteins (e.g. red seaweeds), fibres or minerals. The presence of original pigments such as phycoerythrin also enables the development of functional ingredients (e.g. natural colourants) for the food industry.

Species	Common name	Authorized
<i>Laminaria digitata</i>	Kombu	Restricted use <sup>a</sup>
<i>Laminaria saccharina</i>	Kombu	Restricted use <sup>a</sup>
<i>Undaria pinnatifida</i>	Wakame	+
<i>Himantalia elongata</i>	Sea Spaghetti	+
<i>Ulva</i> sp	Sea Lettuce	+
<i>Enteromorpha</i> sp	Ao-nori	+
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Ogo-nori	+
<i>Palmaria palmata</i>	Dulse	+
<i>Chondrus crispus</i>	Pioca, lichen	+
<i>Spirulina</i> sp <sup>b</sup>	Spiruline	+

<sup>a</sup> Iodine concentration  $\leq 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  of dry weight.  
<sup>b</sup> Cyanobacteria, Data taken from Ref. Mabeau & Fleurence, 1993

**Table 3. Protein contents of some edible seaweeds (Darcy-Vrillon, 1993; Denis et al., 2010; Fleurence, 2004).**

Seaweed species	<i>Laminaria digitata</i>	<i>Ascophyllum nodosum</i>	<i>Undaria pinnatifida</i>	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Palmaria palmata</i>	<i>Porphyra tenera</i>	<i>Gracilaria verrucosa</i>	<i>Grateloupia turuturu</i>
Protein content	8.0–15.0	3.0–15.0	11.0–24.0	8.7–32.7	8.0–35.0	33.0–47.0	7.0–23.0	14.0–27.5
% of dry weight.								

### Application of seaweeds in aquaculture

An indirect route for the human consumption of seaweeds is perhaps by the use of algae in the nutrition of animals usually consumed by people. The use of seaweeds in the diet of terrestrial farm animals has already been described (Hansen, Hector, & Feldman, 2003) and is well known. Conversely, the same application is much less developed in the case of marine animal production by aquaculture.

However, some marine animals produced by aquaculture could be fed by the addition of seaweeds to their diet. This suggestion concerns especially fish and molluscs (e.g. abalone). The advantages of the consumption of seaweeds by marine animals, especially fish, have often been described. For example, numerous studies have reported the beneficial effects of the use of seaweed meal in the diet of fish (Mustafa & Nagakawa, 1995; Mustafa, Wakamatsu, Takeda, & Umino, 1995). The addition of 5% of algae meal increases the growth rate of fish and, in particular, improves protein assimilation, thus decreasing the nitrogen output into the environment. The fish species investigated in these studies are mainly rainbow trout, red sea bream or rockfish.

Another advantage of using algae in the fish diet is an improvement in the stress response and in disease resistance. The positive effect of *Ulva* meal or wet feed including alginate on the immune status of fish such as sea bream or Atlantic salmon has been well known for twenty years (Gabrielsen & Austreng, 1998; Satoh, Nakagawa, & Kasahara, 1987). This finding could be useful for the development of another production method for farmed fish.

As well as the addition of seaweeds to the diet of fish produced by aquaculture, algae could also be very useful in the treatment of waste generated by this activity. Interesting ecological engineering experiments have been described to remove excess nutrients or to treat the waste generated by intensive mariculture (Troell, Rönnbäck, Halling, Kautsky, & Buschmann, 1999). Other authors have also suggested the use of some economical species as a potential solution to nitrogen pollution of the marine

environment (Dongyan, Pickering, & Jun, 2004). Similar applications have been suggested for mollusc farming. Some experiments on the use of algae in the feeding of abalones were reported as being effective (Buchal, Levin, & Langdon, 1998; Mai, Mercer, & Donlon, 1994). In particular, a study showed that a diet composed of a mixture of *Gracilaria gracilis*, *U. lactuca* and kelp gave the best results for the growth of abalone juveniles (Naidoo, Maneveldt, Ruck, & Bolton, 2006).

The feasibility of an integrated system for the culture of seaweed, fish and abalone was tested in Israel (Neori, Shpigel, & Ben-Ezra, 2000). The main goal of this experiment was to optimize nutrient recycling and reduce water consumption by using seaweeds to treat the waste. In this system, the effluents produced by abalone in the culture tanks were drained into the culture tanks of a pellet-fed fish (*Sparus aurata*). The effluents of the fish culture were also drained into the seaweed culture (*U. lactuca* or *Gracilaria conferta*). Finally, the algal production was fed back to the abalone. Similar experiments were carried out in the aquaculture of seabass (*Dicentrarchus labrax*) showing that the use of a high rate algal pond treatment of water led to a significant reduction in the dissolved inorganic nitrogen and phosphorus in the water. This approach also reduced the metal accumulation in fish muscle, which is very interesting in terms of obtaining an improved quality of flesh from cultivated fish (Metaxa et al., 2006).

The use of seaweeds in the diet of marine animals produced by aquaculture appears to be an interesting prospect especially to increase the natural defences of fish and to improve the treatment of wastewater generated by this activity. However, the economic feasibility of this approach needs to be determined first.

### What is the future for the use of seaweed proteins in human nutrition?

The best question is probably “what are the prospects for the use of algal proteins in feeding animals consumed by humans?” Nowadays, the main plant proteins used for

**Table 4. Comparison of the methionine content of several food sources (Fleurence, 2004).**

Food sources	<i>Palmaria palmata</i>	<i>Porphyra tenera</i>	<i>Grateloupia turuturu</i>	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Undaria pinnatifida</i>	<i>Laminaria japonica</i>	Soybean
Maximal methionine content	4.5	1.1	2.0	1.6	2.0	1.4	1.2
g of amino acid/100 g of proteins.							



animal nutrition appear to be those from soybean. However, their use poses some problems.

Firstly, the soybean proteins are imbalanced with regard to some amino acids (e.g. methionine) (Table 4) and their digestibility differs according to the organism. For example, it is not certain that a fish or an abalone possesses an adapted enzymatic system for the degradation of soybean proteins. In this case, the product proposed is necessarily a formulated food and will therefore be more expensive than raw or semi-raw products obtained from seaweeds.

Secondly, the cultivation of soybean requires a large quantity of fresh water. This is not the case for algal resources which do not need fresh water for growth.

Thirdly, the use of soybean proteins for animal feed is an approach which is not always compatible with the ethical food value chain, especially if the proteins have been obtained from genetically modified soybean. This aspect is especially important with regard to consumer opinion about food traceability. However, the world production of soybean was close to  $216 \cdot 10^6$  tonnes compared to  $2 \cdot 10^6$  tonnes for seaweeds and this terrestrial resource still remains the most economical sustainable source of vegetal proteins for animal nutrition.

## Conclusion

The development of the use of seaweeds in human nutrition is not easy in western countries because the algal products are still not well known. The input of algae into human nutrition can be envisaged by an indirect way. This approach appears to be rational especially in the case of the development of an alternative marine aquaculture. The seaweeds which are used as biological filters and food material for farmed animals could easily be included in the human food value chain by this route.

## References

- Buchal, M., Levin, J. E., & Langdon, C. (1998). Dulse *Palmaria mollis* as a settlement substrate and food for the red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture*, *165*, 243–260.
- Darcy-Vrillon, B. (1993). Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *44*, 23–35.
- Dawczynski, C., Schubert, R., & Jahreis, G. (2007). Amino acids, fatty acids and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*, *103*, 891–899.
- Denis, C., Massé, A., Fleurence, J., & Jaouen, P. (2010). Concentration and pre purification with ultrafiltration of a R-phycoerythrin solution extracted from macro-algae *Grateloupia turuturu*: process definition and up-scaling. *Separation and Purification Technology*, *69*, 37–42.
- Denis, C., Morancais, M., Min, L., Deniaud, E., Gaudin, P., Wielgosz-Collin, G., et al. (2010). Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France). *Food Chemistry*, *119*, 913–917.
- Dongyan, L., Pickering, A., & Jun, S. (2004). Preliminary study on the responses of three marine algae, *Ulva pertusa* (Chlorophyta), *Gelidium amansii* (Rhodophyta) and *Sargassum enerve* (Phaeophyta), to nitrogen sources and its availability. *Journal of Ocean University of China*, *3*, 75–79.
- Fleurence, J. (1999). Seaweed proteins: biochemical nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Sciences & Technology*, *10*, 25–28.
- Fleurence, J. (2004). Seaweed proteins. In R. Y. Yada (Ed.), *Proteins in food processing* (pp. 197–213). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Fleurence, J., Gutbier, G., Mabeau, S., & Leray, C. (1994). Fatty acids from 11 marine macroalgae of the French Brittany coast. *Journal of Applied Phycology*, *6*, 527–532.
- Fujiwara-Arasaki, T., Mino, N., & Kuroda, M. (1984). The protein value in human nutrition of edible marine algae in Japan. *Hydrobiologia*, *116/117*, 513–519.
- Gabrielsen, B. O., & Austreng, E. (1998). Growth, product quality and immune status of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed wet feed with alginates. *Aquaculture Research*, *29*, 397–401.
- Galland-Irmouli, A. V., Fleurence, J., Lamghari, R., Luçon, M., Rouxel, C., Barbaroux, O., et al. (1999). Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse). *Journal of Nutritional Biochemistry*, *10*, 353–359.
- Hansen, H. R., Hector, B. L., & Feldman, J. (2003). A qualitative and quantitative evaluation of the seaweed diet of North Ronaldsay sheep. *Animal Feed Science and Technology*, *105*, 21–28.
- Horie, Y., Sugase, K., & Horie, K. (1995). Physiological difference of soluble and insoluble dietary fibre fractions of brown algae and mushrooms in pepsin activity in vitro and protein digestibility. *Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition*, *4*, 251–255.
- Jensen, A. (1993). Present and future needs for algae and algal products. *Hydrobiologia*, *260/261*, 15–23.
- Mabeau, S., & Fleurence, J. (1993). Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Sciences & Technology*, *4*, 103–107.
- MacArtain, P., Gill, C. I. R., Brooks, M., Campbell, R., & Rowland, I. R. (2007). Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition Reviews*, *65*, 535–543.
- Mai, K., Mercer, J. P., & Donlon, J. (1994). Comparative studies of the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino II. Amino acid composition of abalone and six species of macroalgae with an assessment of their nutritional value. *Aquaculture*, *128*, 115–130.
- Marion, O., Schwertz, A., Fleurence, J., Guéant, J. L., & Villaume, C. (2003). Improvement of the digestibility of the proteins of the red alga *Palmaria palmata* by physical processes and fermentation. *Nahrung/Food*, *47*, 339–344.
- Metaxa, E., Deviller, G., Pagand, P., Alliaume, C., Casellas, C., & Blancheton, J. P. (2006). High rate algal pond treatment for water reuse in a marine fish recirculation system: water purification and fish health. *Aquaculture*, *252*, 92–101.
- Mustafa, M. G., & Nakagawa, H. (1995). A review: dietary benefits of algae as an additive in fish feed. *The Israeli Journal of Aquaculture*, *47*, 155–162.
- Mustafa, M. G., Wakamatsu, S., Takeda, T., & Umino, T. (1995). Effect of algae meal as feed additive on growth, feed efficiency, and body composition in red sea bream. *Fisheries Science*, *61*, 25–28.
- Naidoo, K., Maneveldt, G., Ruck, K., & Bolton, J. J. (2006). A comparison of various seaweed-based diets and formulated feed on growth rate of abalone in land-based aquaculture system. *Journal of Applied Phycology*, *18*, 437–443.
- Neori, A., Shpigel, M., & Ben-Ezra, D. (2000). A sustainable integrated system of culture of fish seaweed and abalone. *Aquaculture*, *186*, 279–291.
- Nisizawa, K., Noda, H., Kikuchi, R., & Watanabe, T. (1987). The main seaweed foods in Japan. *Hydrobiologia*, *151/152*, 5–29.
- Noguchi, T., Matsui, T., Miyazawa, K., Asakawa, M., Iijima, N., Shida, Y., et al. (1994). Poisoning by the red alga “Ogonori” (*Gracilaria verrucosa*) on the Nojima coast Yokohama, Kanagawa Prefecture, Japan. *Toxicon*, *32*, 1533–1538.

Satoh, K., Nakagawa, H., & Kasahara, S. (1987). Effect of Ulva meal supplementation on disease resistance of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 1115–1120.

Troell, M., Rönnbäck, P., Halling, C., Kautsky, N., & Buschmann, A. (1999). Ecological engineering in aquaculture: use of seaweeds for

removing nutrients from intensive mariculture. *Journal of Applied Phycology*, 11, 89–97.

Zemke-White, W. L., & Ohno, M. (1999). World seaweed utilisation: an end-of-century summary. *Journal of Applied Phycology*, 11, 369–376.



## Experience ScienceDirect your way through SciVerse Applications

Open to accelerate science

Now **SciVerse Hub**, **ScienceDirect** and **Scopus** content can be explored the way you want to slice, dice, mold and model it. Master the discovery process with **SciVerse Applications** – an expanding gallery of tools that helps you:

- Collaborate with peers
- Manage workflows
- Customize searches
- Analyze data

Explore the possibilities at  
[www.applications.sciverse.com/action/gallery](http://www.applications.sciverse.com/action/gallery)







## Annexe 4

Extraction and purification of R-phycoerythrin pigment from the edible red seaweed  
*Grateloupia turuturu*.

Mathilde Munier, Michèle Morançais, Justine Dumay, Pascal Jaouen, Joël Fleurence

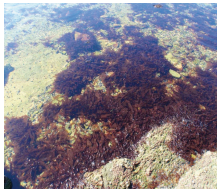
Poster présenté lors du 6ème colloque international et rencontres d'affaires: ingrédients cosmétiques et biotechnologies, COSM'ING 2013. CBB-DEVELOPPEMENT. 26-28 JUIN 2013, Saint-Malo.



# Extraction and purification of R-phycoerythrin pigment from the edible red seaweed *Grateloupia turuturu*



Mathilde Munier, Michèle Morançais,  
Justine Dumay, Pascal Jaouen, Joël Fleurence



Grateloupia turuturu in situ



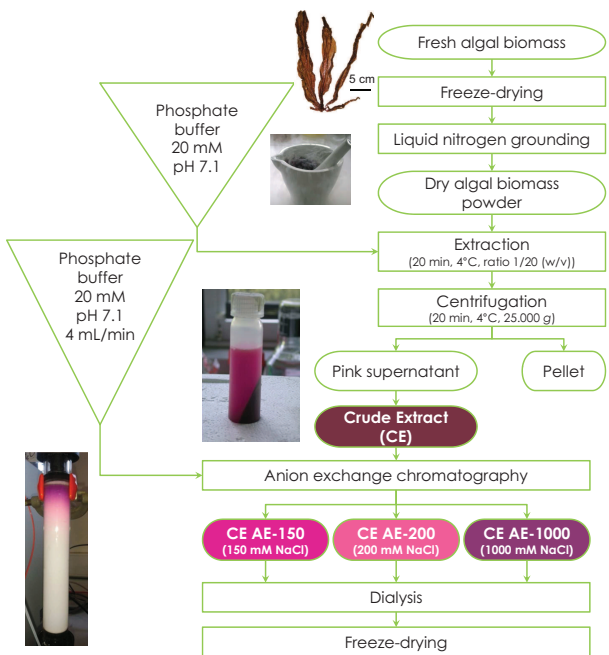
R-PE crude extract

## INTRODUCTION

Dyes and colorants from natural sources are gaining importance mainly due to health and environmental issues. R-phycoerythrin (R-PE) and phycobiliproteins in general are commonly used for their fluorescent properties in biotechnical techniques and clinical diagnoses (Isailovic et al. 2006) and for their colorant properties in food preparation (Fleurence 2004). Methods have been developed to obtain high purity R-PE. However, the traditional protocols performed in R-PE purification involving ammonium sulfate precipitation and chromatography techniques provide long and complex procedures.

In this work, an one-step chromatography method is provided for the efficient separation and purification of R-PE from *Grateloupia turuturu*, involving only ion-exchange chromatography on a DEAE-Sepharose Fast Flow column.

## PURIFICATION PROCEDURE



### Monitoring:

- > Spectrophotometer (Purity ratio and yield)
- > Gel filtration chromatography (Molecular weight)
- > SDS-PAGE (Purity)

## CONCLUSION

R-phycoerythrin was extracted and purified from the red seaweed *Grateloupia turuturu* by one-step ion exchange chromatography using a three-step increase in buffer ionic strength. Two forms of R-PE were carried out by gel filtration chromatography: a native form with a molecular weight of 260 kDa and a dissociated protein with a molecular weight of 60 kDa. This protocol allowed to obtain native R-PE with a purity index of 2.89 and a recovery yield of 27%.

### References:

- Isailovic D., Sultana I., Phillips G. J. and Yeung E. S. (2006). "Formation of fluorescent proteins by the attachment of phycoerythrin to R-phycoerythrin alpha and beta apo-subunits." *Analytical Biochemistry* **358**(1): 38-50.
- Fleurence J. (2004). Seaweed proteins. *Proteins in food processing*, R. Y. Yada, Cambridge; New-York, Woodhead Publishing Limited; CRC Press LLC: 197-213.

## RESULTS

### R-PE extraction

The color of CE was pink (Fig.1A). Absorption spectrum of CE (Fig.1 B) was typical for phycoerythrins contained PUB and PEB with three maxima at 498, 540 and 565 nm. The R-PE amount in CE is calculated at 5,28 mg.g<sup>-1</sup> dw and the PI is 0.41. The gel elution pattern of the CE (Fig.1 C) showed five peaks at 280 nm and two major peaks at 565 nm. The molecular weights of the two peaks have been estimated from the calibration curve : 260 kDa for first peak corresponding to the native R-PE and 60 kDa for the second matching to the dissociated protein. The SDS page gel (Fig.1C) confirmed the presence of a large amount of hydrosoluble proteins.

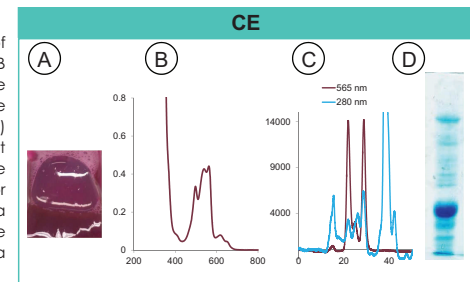


Fig.1: color, spectrum, GF chromatogram and SDS profile of the CE

### Purification of RPE by anion exchange chromatography

A weak anion-exchange resin (DEAE Sepharose) was used to purified R-PE. Fig. 2 showed the semi-preparative anion-exchange pattern of CE. The elution was carried out using a three-step increase in buffer ionic strength (0-150 mM, 150-200 mM, 200-1000 mM). Three fractions were collected and respectively named CE AE-150, CE AE-200 and CE AE-1000.

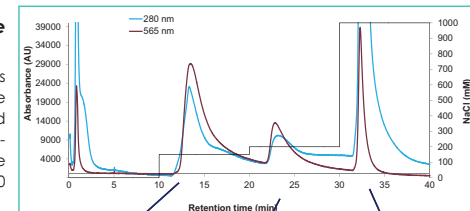


Fig.2: semi-preparative anion exchange chromatogram of the CE

### Purity evaluation

Fig. 3 showed the color, absorbance spectrum and gel filtration chromatogram of each fraction.

The CE AE-150 presented a pink color (Fig.3 A) and a spectrum with two maxima absorption at 498 and 540 nm (Fig.3 B). On gel filtration, one major peak was detected corresponding to the 60 kDa dissociated protein (Fig.3 C).

The CE AE-200 fraction presented also a pink color (Fig.3 D) and a spectrum characteristic of R-PE with the three maxima at 498, 540 and 565 nm (Fig.3 E). The chromatogram showed one peak corresponding to native R-PE (Fig.3 F).

The CE AE-1000 fraction showed a purple color (Fig.3 G) and the spectrum indicated the presence of phycocyanin ( $\lambda_{max} = 620$  nm) and allophycocyanin ( $\lambda_{max} = 650$  nm) (Fig.3 H). Several peaks were observed on gel filtration pattern (Fig.3 I).

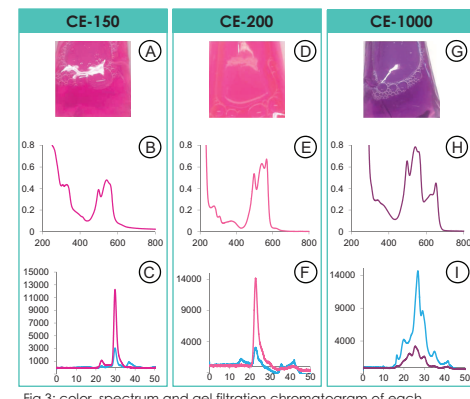


Fig.3: color, spectrum and gel filtration chromatogram of each fractions after DEAE

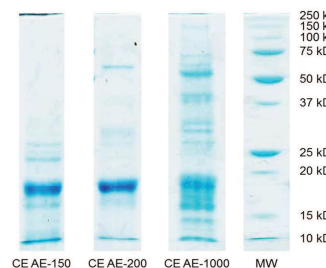


Fig.4: SDS-PAGE analysis of the CE and the fractions. MW= Molecular Weights markers

### Yield and purity ratio

From the absorption spectra, purity ratio and yield have been calculated. They were presented in Fig. 5. The anion exchange chromatography allowed to obtain a CE AE-200 fraction with a PI of 2.89, that was 7 fold more important than PI of the CE (0.41) and a yield of 27%. Moreover, the  $A_{620}/A_{565}$  and  $A_{650}/A_{565}$  values were 0.01 and 0.04 respectively which demonstrated the absence of phycocyanin and allophycocyanin contaminants.

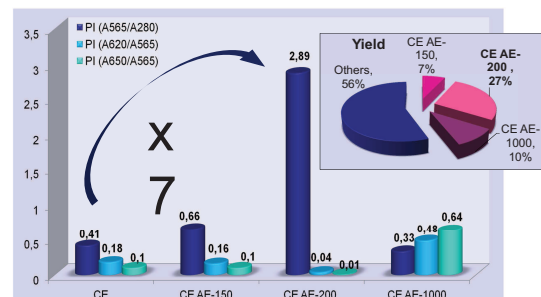
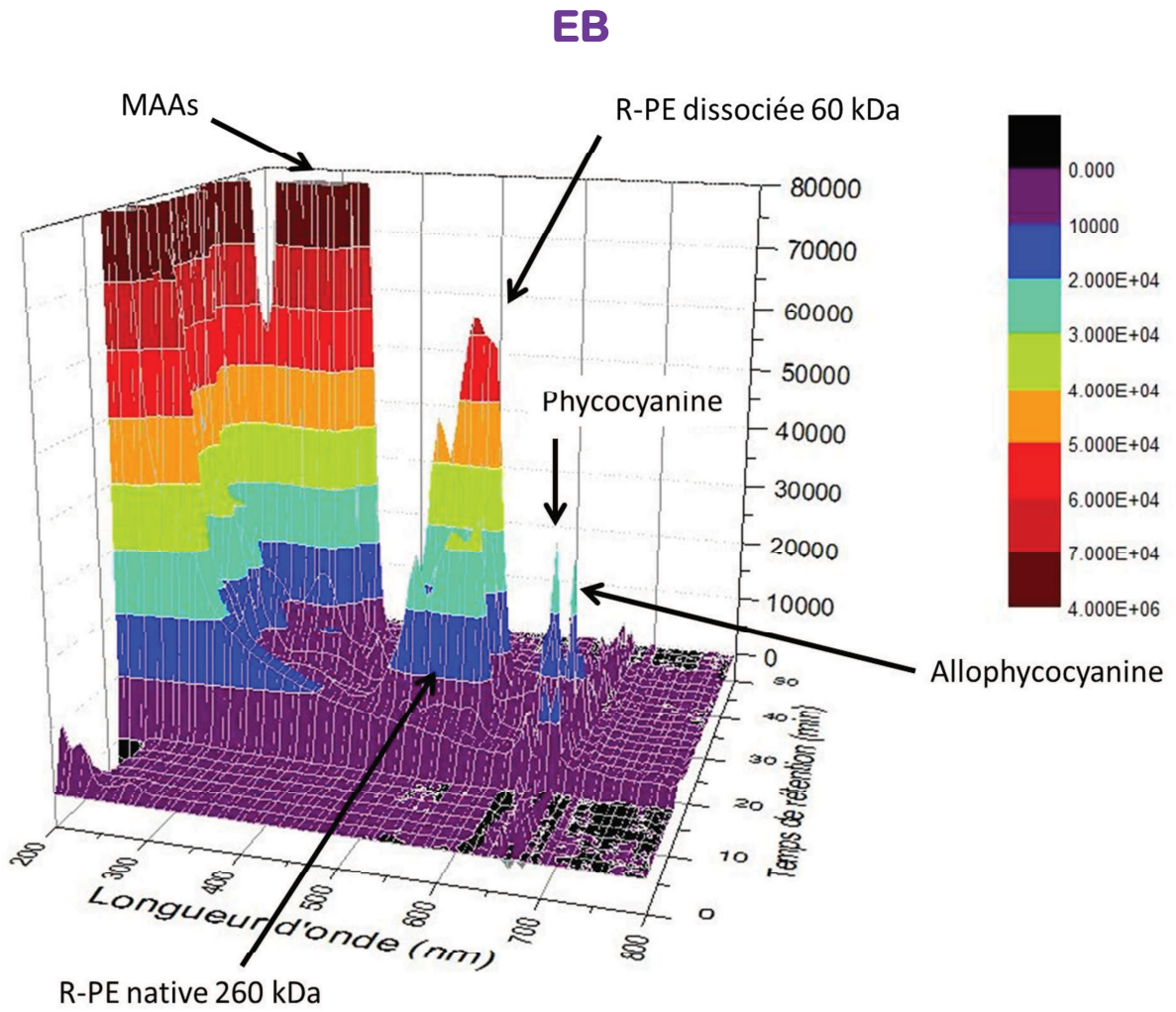


Fig.5: The purity index and yield of R-PE in the CE and fractions obtained after the anion exchange chromatography

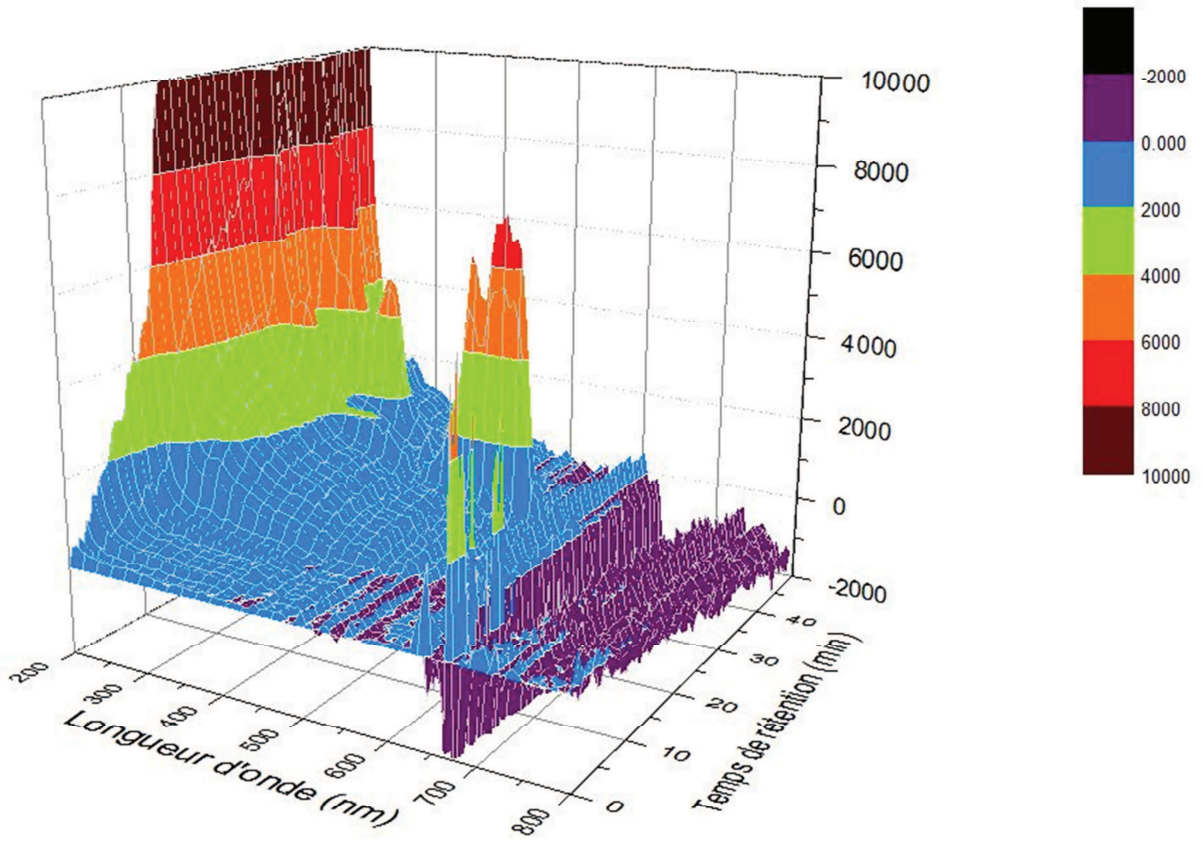


# Annexe 5

Profils chromatographiques en 3D de l'extrait brut et des fractions purifiées

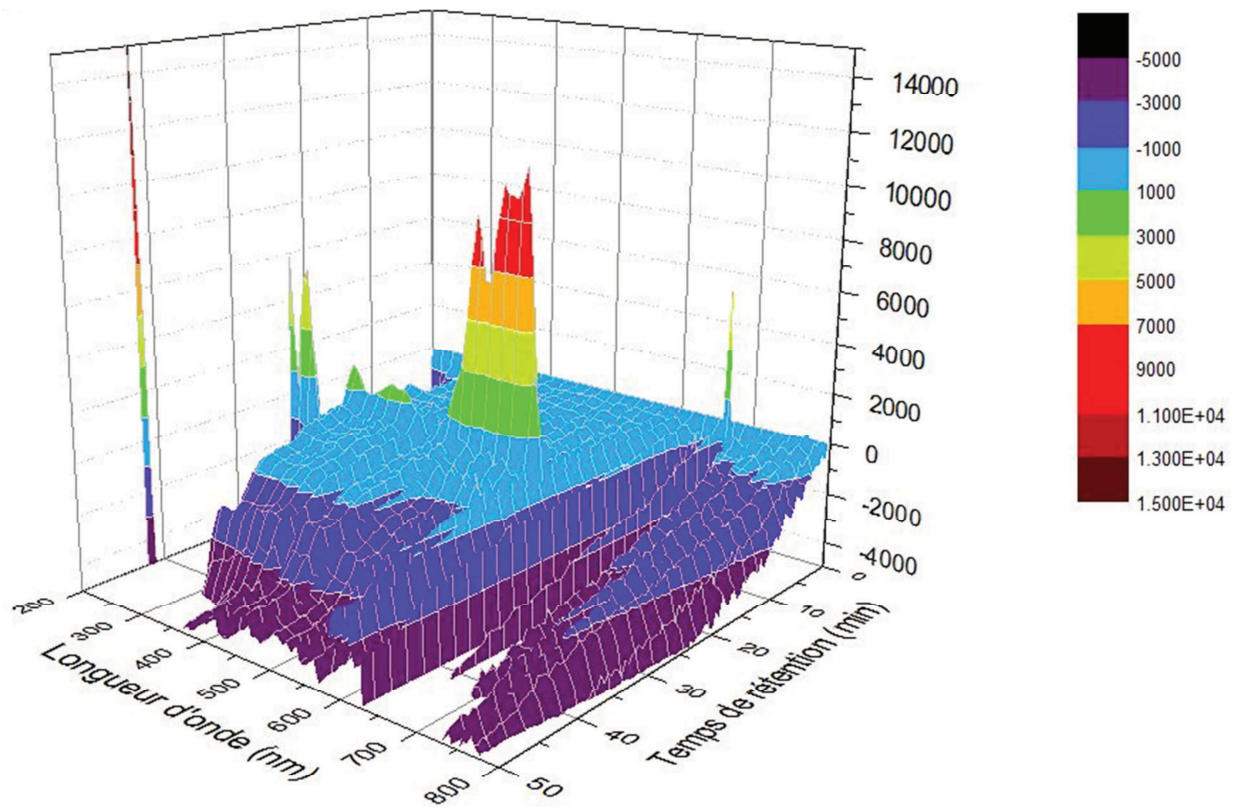


## EA-150 (R-PE dissociée 60 kDa)

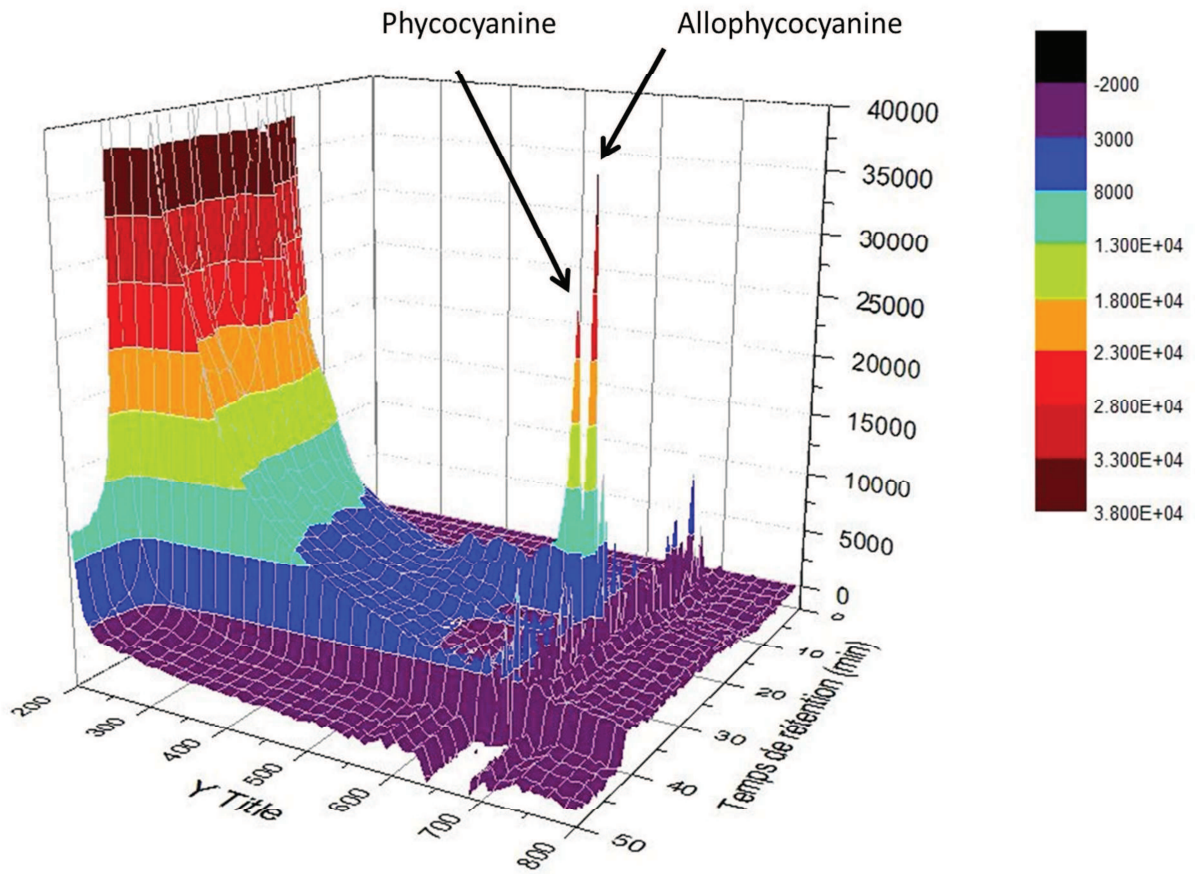




## EA-200 (R-PE native 260 kDa)



## EA-1000



## Annexe 6

Quelques recettes de cuisine à base d'algues  
([http://www.algopole.fr/quelques-recettes\\_0.php](http://www.algopole.fr/quelques-recettes_0.php))



### Tartare d'algues

Ingrédients :

15 g de salade du pêcheur . 1 petite cuillère de câpres . 6 cornichons . 1 échalote . 6 petits oignons blancs . huile d'olive . huile de noix . 8 olives dénoyautées . piment d'Espelette . sel, poivre .

Réhydratez les algues 15 à 30 secondes dans de l'eau froide, puis égouttez les. Mixez grossièrement les cornichons, les oignons, les olives, les câpres et l'échalote. Mélangez avec les algues. Ajoutez deux pincées de piment d'Espelette, 2 cuillères à café d'huile d'olive et une cuillère d'huile de noix. Assaisonnez.

Vous pouvez déguster ce tartare sur des toasts à l'apéritif. Vous pouvez également l'intégrer dans la composition de vos salades de crudités, avec du saumon fumé, de la feta...



### Omelette à la Nori

Ingrédients

8 oeufs . 5 g de Nori . 1 cuillère à soupe de lait . sel, poivre .

Dans un saladier, fouettez les oeufs.  
Ajoutez le lait, assaisonnez.  
Faites cuire l'omelette dans une poêle.  
Pendant ce temps, faites griller les algues sèches pendant une minute au grill.  
Saupoudrez les algues grillées 2 min avant la fin de la cuisson.



## RÉSUMÉ

De par son caractère prolifératif, l'algue rouge *Grateloupia turuturu* présente sur la côte atlantique, constitue une biomasse disponible valorisable au travers d'un pigment photosynthétique, la R-phycoérythrine. Les deux objectifs de cette étude s'articulent sur un plan fondamental et un plan valorisation. Du point de vue fondamental, il a été mis en évidence des relations étroites entre environnement, biologie et contenu biochimique. Après caractérisation de cette biomasse, un protocole de purification a été mis au point et a permis l'obtention d'un pigment concentré en R-PE et partiellement purifié. Cette étude a permis de caractériser ce pigment et de mettre en évidence deux formes de R-PE. Des études de stabilité ont été réalisées à partir d'extraits bruts. La R-PE est stable pour une gamme de pH allant de 4 à 10, jusqu'à 40°C lorsqu'elle est en solution et placée à l'obscurité. Pour la préservation de la structure du pigment, l'ajout de protectants est à proscrire. Pour les conditions de stockage du pigment, il est préférable de le stocker à -20°C pour une application en tant que colorant. Dans un objectif d'étude du pigment, il est préférable de le stocker à 4°C mais il faudra nécessairement ajouter des conservateurs pour le maintenir stable dans le temps. L'acide ascorbique semble être un conservateur efficace. Ces résultats ont permis de caractériser la R-PE et de mettre en avant les interactions entre environnement, matériel biologique et contenu biochimique, mais également de souligner l'intérêt d'utiliser l'espèce *Grateloupia turuturu* comme source de pigment naturel rouge applicable dans les domaines de la cosmétique et de l'alimentaire.

**Mots-clés :** *Grateloupia turuturu*, R-phycoérythrine, pigment, purification, chromatographie d'échange d'anions, stabilité

## ABSTRACT

The proliferative red seaweed *Grateloupia turuturu* from the Atlantic coast is a recoverable biomass available through a photosynthetic pigment, R-phycoerythrin. This study has two objectives focused on a fundamental level and development level. From a fundamental point of view, this study has highlighted the close relationship between the environment, biology and biochemical content. After biomass characterization, a purification protocol has been developed and allowed to obtain a concentrated partially purified R-PE. In addition to the characterization of this pigment, two forms of R-PE have been described. Stability studies were carried out using crude extracts. R-PE is stable to a pH ranging from 4 to 10, up to 40°C and when stored in the dark. To preserve the structure, for an application as colorant, it is suitable to store the pigment at -20°C. In an analytical point of view, it is preferable to store the R-PE at 4°C but it will be necessary to add preservatives to maintain a stable pigment over time. In this context, ascorbic acid appears to be an effective preservative. These results were used to characterize the R-PE pigment and highlighted the interactions between the environment, biological material and biochemical content, but also to emphasize the benefits of using the proliferative specie *Grateloupia turuturu* as a natural red pigment source, applicable in the fields of cosmetics and food.

**Keywords :** *Grateloupia turuturu*, R-phycoerythrin, pigment, purification, anion exchange chromatography, stability