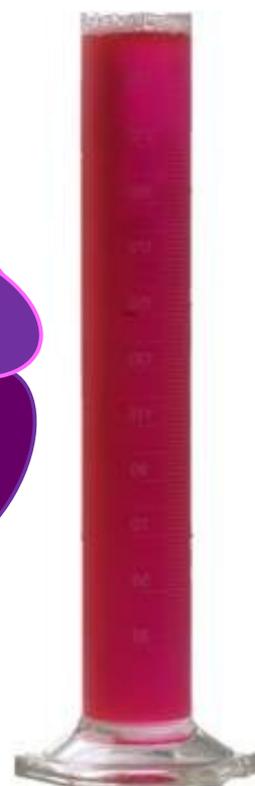
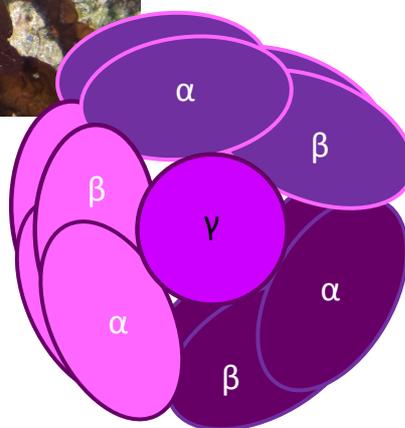


Potentialités de valorisation de la R-Phycoérythrine issue de la macroalgue proliférante *Grateloupia turuturu* : Optimisation de l'extraction par voie enzymatique et recherche de nouvelles applications

« GRAPHYQUE »



Positionnement : Qualité des produits – Valorisation, nouveaux débouchés

Coordinatrice du projet :

Justine Dumay, Maître de conférences
 Tel : 02 51 12 56 70
 Fax : 02 51 12 56 68
justine.dumay@univ-nantes.fr



RESUME

Les macroalgues rouges sont largement distribuées sur les côtes Européennes et sont représentées par environ 300 espèces. *Palmaria palmata* et *Grateloupia turuturu* sont deux des principales espèces rencontrées sur les côtes Ligériennes et représentent une biomasse importante. Alors que la première espèce est autorisée en nutrition humaine en France, la seconde, bien que de composition biochimique proche, n'a pas encore reçu son accréditation. L'activité algues alimentaires en France a débuté dans les années 70, essentiellement par l'intermédiaire de la diététique. *Palmaria palmata* est l'algue alimentaire la plus exploitée en France après *Laminaria digitata*, une algue brune surtout exploitée pour sa composition en phycocolloïdes.

De surcroît, les algues rouges possèdent un pigment protéique surnuméraire d'intérêt, la R-Phycoérythrine (R-PE). Ce pigment, dont les caractéristiques spectrales particulières lui confèrent de réels attraits, est valorisé dans des domaines variés tels que et la biomédecine (sonde immunologique, imagerie médicale) ou l'agroalimentaire (colorant). A l'heure actuelle, les procédés de purification demeurent très coûteux et ne sont pas optimisés conduisant à une sous exploitation de cette ressource et à des prix de vente élevés (prix de vente pouvant aller jusqu'à 300€/mg).

De récentes études ont démontré l'opportunité de l'utilisation de procédés enzymatiques pour déstructurer les matrices marines facilitant l'extraction de composés d'intérêt. Dans ce contexte, il apparaît judicieux d'exploiter ce type de procédé en vue d'extraire les molécules hydrosolubles d'intérêt à partir de macroalgues. Ainsi, le travail proposé dans ce projet portera d'une part sur l'optimisation des conditions d'hydrolyse (choix des enzymes, conditions d'hydrolyse ...) et d'autre part sur la purification partielle de la R-PE et des peptides la composant afin de rechercher d'éventuelles activités biologiques.

Cette protéine pigment peut être utilisée native mais pourrait également se révéler une ressource importante de molécules à activité biologique et notamment de peptides. En effet, la conversion de protéines en peptides au moyen de l'hydrolyse enzymatique fait partie des voies de valorisation à la fois traditionnelles (cracking extensif des protéines du lait en hydrolysats fonctionnels) et novatrices (utilisation de nouvelles enzymes et protéines substrats pour générer de nouvelles molécules). De nombreux peptides bioactifs ont été identifiés dans des hydrolysats de produits et coproduits marins. Les activités biologiques peuvent concerner la santé humaine, animale, la cosmétique et l'agroalimentaire. Si les protéines de poissons, de crustacés et de mollusques sont des sources déjà identifiées, très peu sont issus d'algues. Les activités biologiques potentielles des peptides pouvant être issues de la R-PE n'ont encore pas été étudiées à ce jour (activité inhibitrice d'enzymes, antibactériennes). Elles pourraient s'avérer d'un grand intérêt économique.

Suite à la conduite de ce travail préliminaire, les voies de valorisation de ces composés pourront être mieux ciblées afin de proposer aux acteurs aquacoles de la région des activités complémentaires potentielles. Une étude plus approfondie pourra être envisagée pour permettre la mise en place de procédés innovants et économiquement viables d'obtention de la R-PE et de ses dérivés.

A – Objectifs et contexte :

Les algues marines constituent une ressource biologique importante et exploitée. Selon la FAO, l'industrie des algues marines utilise au niveau mondial environ 16 millions de tonnes d'algues humides par an, d'origine naturelle ou cultivée (FAO, 2010). Cette exploitation génère annuellement 5,5 à 6 millions de dollars US, dont 20 % provient des produits alimentaires destinées à la consommation humaine, la partie restante correspondant pour une large part à des composés d'intérêt extraits des algues (phycocolloïdes...) (C. Denis, 2009). Ce constat mondial est malheureusement contrasté lorsqu'il est considéré au niveau continental, puisque 97% du tonnage d'algue utilisé dans le monde est récolté ou cultivé en Asie (FAO, 2010). Le conseil régional de Bretagne, via l'agence Bretagne Développement Innovation, vient de faire paraître le rapport Breizh'Alg dans lequel est dressé un état des lieux de la filière algue en France, en Europe et à l'international. Avec environ 180 000 t d'algues récoltées en 2011, la France se place au 9ème rang des consommateurs d'algues dans le monde, et au 10ème rang des producteurs (F. Rode et al., 2012). La filière algue en Bretagne couvre 90% de la filière nationale. Or seules 26 entreprises de transformation ont été recensées. D'après une analyse FFOM (forces, faiblesses, opportunités, menaces), la filière algue en France semble prometteuse mais peu de voies de valorisations sont à ce jour exploitées.

Le projet GRAPHYQUE est né de la recherche de voies de valorisation de la biomasse algale disponible sur le littoral Ligérien et de la nécessité de proposer une activité complémentaire aux professionnels de la filière conchylicole/ostréicole. Cette adéquation Recherche-besoin d'une filière doit permettre la mise en place d'un procédé innovant permettant de valoriser une ressource marine disponible. Pour la réalisation de ce projet, 3 universités du grand ouest (l'Université de Bretagne Ouest, l'Université de Nantes et l'Université de La Rochelle) se proposent de mettre en commun leurs compétences pour parvenir à un cheminement complet du traitement de la ressource :

- Collecte
- Hydrolyse de la matière première
- Caractérisation de l'hydrolysate
- Purification
- Séparation des composés
- Criblage d'activités biologiques
- Proposition de voies de valorisation

En 2007, près de 300 brevets portant sur l'extraction, la purification et l'utilisation des phycobiliprotéines ont été déposés, principalement aux Etats-Unis, au Japon et en Europe (S. Sekar et M. Chandramohan, 2008), démontrant ainsi l'intérêt de ces pigments surnuméraires. La valorisation de ces molécules en général, et de la R-PE en particulier, peut-être envisagée différemment, en fonction du grade de pureté et du domaine d'application (Tableau 1).

Tableau 1 : Exemple de valeur marchande des algues rouge et de la R-phycoérythrine (R-PE) en fonction de la pureté (J. Dumay et al., 2011b)

Algue fraîche (Nori par ex.)	1 200 € / tonne
Algue séchée (Nori par ex.)	16 000 € / tonne
Extrait enrichi en R-PE	176 € / L
R-PE pure	De 90 à 390 € / mg
R-PE activée SMCC	140€ / mg
anticorps anti-phycoérythrine	352,56€ / 1 mL

Remarque : La valeur marchande utilisée ici est celle du Nori (*Porphyra* sp.) ; *Grateloupia turuturu* n'ayant à ce jour aucune valeur marchande

Ce projet vise à proposer un procédé ayant à ce jour été peu optimisé et dont les retombées industrielles peuvent être importantes. Le travail proposé tend à considérer le procédé dans son ensemble, que ce soit du point de vue génie enzymatique (choix des enzymes, des paramètres d'hydrolyse, optimisation des conditions, changement d'échelle), du point de vue biochimique (purification, connaissance des matrices biologiques, recherche d'activité biologique) et du point de vue de la valorisation globale d'une ressource.

Il s'agira ainsi lors de cette étude de :

- Sélectionner les bons cocktails enzymatiques en fonction de la composition pariétale de l'algue et des composés d'intérêt ciblés
- Fractionner les hydrolysats obtenus par techniques chromatographiques et/ou électrophorétiques
- Valoriser les fractions protéiniques par criblage d'activité enzymatique
- Accroître les connaissances de la ressource, tant au niveau de la composition pariétale que sur la structure des molécules d'intérêt.

B – Description du projet :

Ce sujet possède un caractère interdisciplinaire, tant il traite à la fois de biotechnologie marine, de génie enzymatique et de biochimie structurale. A ces matières fondamentales s'ajoute un aspect sociétal puisque le projet a comme perspective la valorisation de la ressource algale à ce jour peu ou pas exploitée sur les côtes Européennes.

La totalité du projet s'articule donc autour d'un pigment, la R-PE, comme le décrit la Figure 1. GRAPHYQUE initie cette recherche et est constitué des seules parties extraction et applications. Un bref descriptif des parties structure et exploitation rationnelle permet de dresser une vue d'ensemble de cette vaste étude qui se prolongera sur plusieurs années.

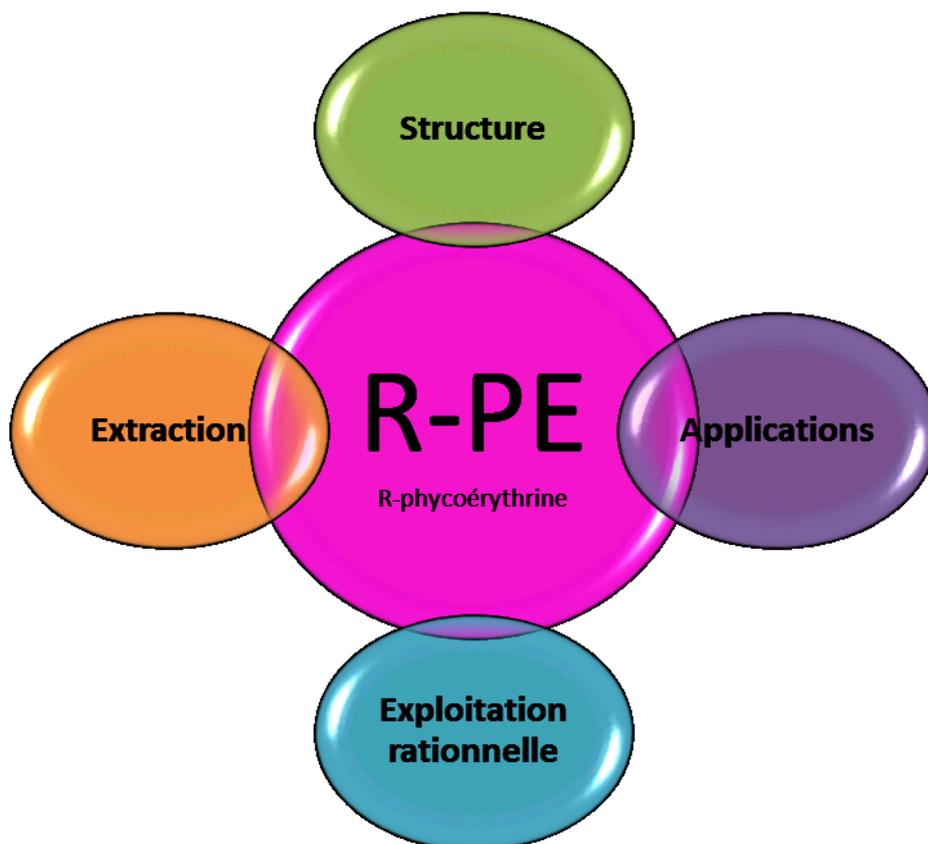


Figure 1 : Description du projet GRAPHYQUE

1. L'extraction

Grateloupia turuturu est une espèce de Rhodophycées rencontrée habituellement sur les côtes Bretonnes et Ligériennes. Alors que certaines algues rouges, comme *Palmaria palmata* sont autorisées en alimentation humaine en France, *G. turuturu* ne l'est à l'heure actuelle que sur le continent asiatique. Ces deux macroalgues possèdent un pigment protéique surnuméraire d'intérêt, la R-PE, impliqué dans la photosynthèse et réserve potentielle d'azote pour le turn-over protéique. Ce pigment aux caractéristiques spectrales particulières, notamment une couleur rose-orangée et une très forte fluorescence à 575 nm, lui confèrent de réels attraits. Il est utilisé comme colorant alimentaire au Japon et également comme sonde moléculaire fluorescente destinée à l'imagerie médicale. A ce jour, les procédés d'extraction et de purification demeurent très coûteux et longs.

Des études récentes ont montré l'intérêt d'utiliser des procédés enzymatiques pour détruire la matrice et ainsi faciliter l'accès au contenu hydrosoluble (J. Fleurence, 1999) voire même de faciliter l'extraction de la R-PE (J. Fleurence, 2003; J. Fleurence et al., 2002). Même si certaines espèces apparaissent comme plus réceptives à ce mode de traitement (C. Denis et al., 2009), l'optimisation par plan d'expériences permet dans bien des cas d'augmenter les rendements d'extraction tout en minimisant les coûts (J. Dumay et al., 2006) même en considérant les algues rouges et la R-PE (J. Dumay et al., 2011a). Dans ce contexte, il apparaît judicieux de s'intéresser au procédé d'hydrolyse enzymatique en vue d'extraire les molécules hydrosolubles d'intérêt. Ainsi, le travail portera dans un premier temps sur la mise en place du procédé enzymatique (choix du bioréacteur, du support enzymatique, du mélange enzymatique en fonction de la nature de la paroi...). Les conditions d'hydrolyse (température, durée, quantité d'enzyme...) seront étudiées et optimisées de façon à extraire les quantités de R-PE les plus importantes. Dans un deuxième temps, l'hydrolysate sera soumis à une purification partielle de ces composés par le biais de techniques chromatographiques et/ou électrophorétiques. Les fractions protéiques ainsi obtenues seront étudiées et les sous-unités de la R-PE séparées.

2. Les applications

La R-PE est une des protéines solubles spécifiquement rencontrée chez les algues rouges. Elle appartient aux phycobiliprotéines, pigments responsables du captage de l'énergie lumineuse situés dans les chloroplastes des algues rouges et cyanobactéries (A. V. Galland-Irmouli et al., 2000). La nature protéique de la R-PE lui confère un grand nombre d'applications potentielles d'un grand intérêt économique (S. Sekar et M. Chandramohan, 2008). En addition de ses propriétés colorantes, la R-PE possède une fluorescence à 578 nm lorsqu'elle est excitée à 475 nm. La R-PE peut ainsi être employée comme colorant alimentaire, agent fluorescent ou comme composé bioactif selon le degré de pureté obtenu après purification. La R-PE est largement utilisée dans les pays asiatiques en tant que colorant alimentaire, et est désormais utilisée dans des domaines de plus en plus divers tels que les divertissements, la récréation et l'amusement : jouets, peintures, textiles, cosmétiques, poudres de bain, gélatines alimentaires, boissons (bières, champagne, vins, sodas). La R-PE et les phycobiliprotéines peuvent aussi être exploitées en tant qu'agent fluorescent : transfert d'énergie, marqueur fluorescent, cible, traceur, utilisés largement en cytométrie de flux, dosage immunologiques, immunophénotypages ou autres études fluorescentes (A. Glazer, 1994; D. Isailovic et al., 2006; S. Sekar et M. Chandramohan, 2008).

Récemment, la R-PE a également démontré des activités biologiques. Des propriétés antitumorales ont ainsi été recensées. Les sous-unités responsables de l'activité ont été considérées comme une option intéressante pour améliorer la sélectivité de la thérapie photodynamique dans le traitement de tumeurs murines et de carcinomes hépatiques humains (S. Sekar et M. Chandramohan, 2008). D'autres études ont montré des effets antioxydants (C. n. Fitzgerald et al., 2011; R. Pangestuti et S.-K. Kim, 2011), antidiabétiques, antitumoraux (C. n. Fitzgerald et al., 2011), immunosuppresseurs et antihypertensifs (R. E. Cian et al., 2012). De plus, les algues rouges sont réputées pour leur panel de molécules bioactives avec un large éventail d'applications (cytotoxique, antiviral, anti-inflammatoire, anti radicaux libres, neurophysiologiques, insecticides, antimicrobien) (A. A. El Gamal, 2010; M. Plaza et al., 2008).

La dégradation de la R-PE en peptides n'a jamais été conduite à ce jour. L'hydrolyse des protéines en peptides conduit très souvent à la génération de peptides bioactifs, aussi

appelés cryptides (Auteliano *et al.* 2006). Leur séquence bioactive est cachée, cryptée au cœur de la protéine mère et libérée suite à l'action de protéases. Les activités biologiques recherchées et principalement identifiées concernent surtout la santé humaine : peptides potentiellement antihypertenseurs, anticoagulants, antidiabétiques, capables de réduire des dysfonctionnements métaboliques ou des risques associés à des pathologies comme les maladies cardiovasculaires (Kim et Wijesekara, 2010). D'autres peptides ont été identifiés comme intéressant l'agro-alimentaire, la nutrition ou bien la préservation des aliments. Dans ce cas, les activités identifiées concernant la réduction de la dégradation des produits, la réduction de l'oxydation, la recherche d'antimicrobiens... Ces peptides sont de toute taille. Si des inhibiteurs d'enzyme sont généralement constitués d'un petit nombre d'acides aminés (2 à 3 acides aminés), les peptides antioxydants ou antimicrobien sont souvent plus grands. Ainsi, au sein d'un hydrolysats rassemblant une large population peptidique, de nombreuses activités biologiques pourront être retrouvées

Cette étape du projet nous permettra de cibler les différents domaines d'applications potentiels en fonction du stade de purification obtenu ainsi que des résultats des tests biologiques, comme décrit dans la Figure 2.

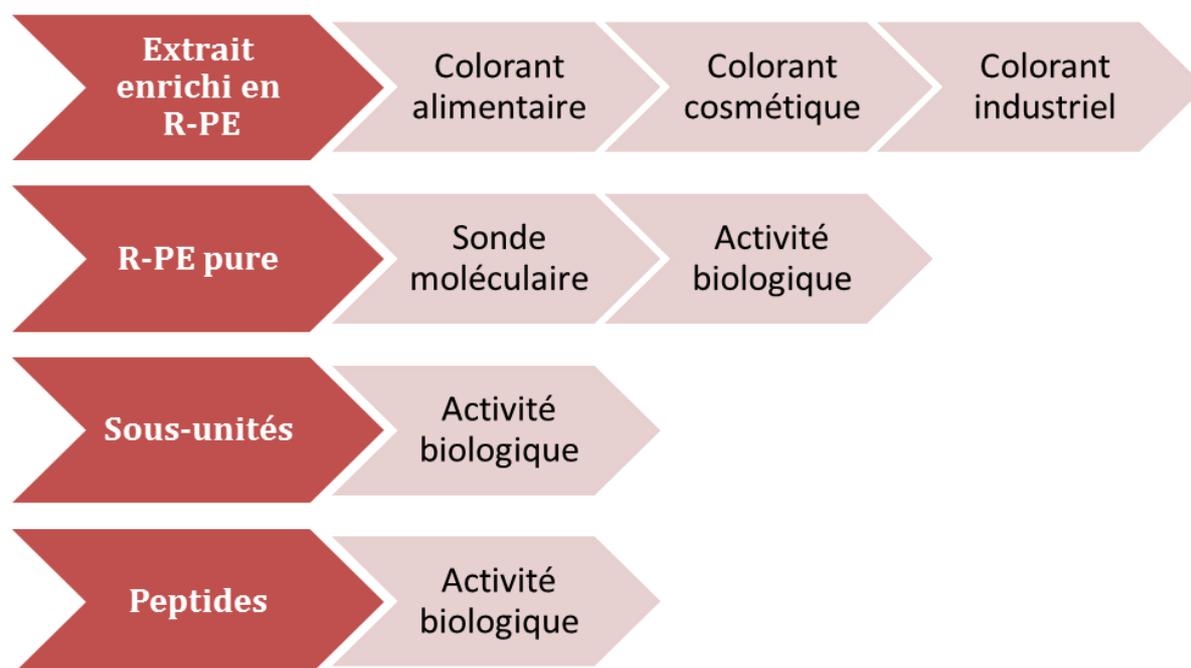


Figure 2 : Valorisation de la R-phycoérythrine (R-PE) en fonction de la pureté des fractions obtenues.

Après l'extraction enzymatique et la purification de la R-PE, une étape de protéolyse sera appliquée. Les peptides résultant de cette nouvelle étape d'hydrolyse seront caractérisés par les techniques biochimiques (dosage des amines libres, présences d'acides aminés aromatiques, liaisons peptidiques) et analytiques maîtrisées au laboratoire (gel filtration, électrophorèse, chromatographie en phase inverse, spectrométrie de masse).

Les hydrolysats obtenus seront simultanément soumis aux différents tests d'activité biologique proposés par les partenaires du projet. Ces tests consisteront dans un premier temps à une recherche d'activités inhibitrices d'hydrolases isolées. Ces enzymes sont choisies comme intervenant dans des réactions clefs pouvant mener à des désordres métaboliques.

L'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, enzyme clé du système rénine angiotensine régulant la tension artérielle sera recherchée. Au moins trois substrats spécifiques de cette enzyme seront utilisés et associés à deux molécules de référence : un inhibiteur chimique : le captopril et une molécule non inhibitrice. L'inhibition des enzymes responsable de la digestion des substances amylacées sera également recherchée. Alpha-amylase et alpha-glucosidase interviennent dans les premières étapes de la dégradation des produits amylacés en sous unités simples. Celles-ci traversent la barrière sanguine et peuvent augmenter fortement le taux de glycémie. Une inhibition de ces enzyme peut conduire à une moindre digestion des sucres et donc à un risque moindre de diabète de type II.

3. La structure de la R-PE

Une fois les sous-unités de la R-PE disponibles, une étude visant à approfondir les connaissances fondamentales de la protéine sera envisagée. Cette partie fera appel à la biologie moléculaire (séquençage de la protéine, clonage de gènes).

4. L'exploitation rationnelle

Enfin, la dernière partie de l'étude visera à considérer les autres fractions générées lors de l'hydrolyse de l'algue : caractérisation de la fraction insoluble. De cette caractérisation partira les différentes voies de valorisation : milieu de culture, minéraux, lipides...

C - Résultats et potentiel de développement :

A terme, ce travail pourra donner lieu à la mise en place d'un procédé industrialisable d'obtention des extrais enrichis en R-PE à haute valeur ajoutée :

- en nutrition humaine en tant que colorant alimentaire
- en cosmétique en tant que colorant également.

D'autre part, les extraits peptidiques pourront eux aussi être valorisés :

- en alimentation humaine en tant que source de protéines
- en alimentation animale, aquaculture en tant qu'alternative aux protéines de soja par exemple
- en santé si des activités biologiques ont été révélées

Les réponses des principales questions soulevées par le sujet pourront donner lieu à des publications :

- Quelle est la meilleure stratégie enzymatique pour extraire la R-PE de macroalgues rouges ?
- Quel est le comportement d'extraction de la R-PE au cours de l'hydrolyse enzymatique ?
- Comment améliorer la pureté de l'extrait de R-PE ?
- De quoi est composé l'hydrolysate d'algue ?
- Que pouvons-nous apprendre de la composition pariétale d'algues rouges en les hydrolysant ?
- Quelles sont les activités biologiques des extraits de macroalgues rouges obtenus par hydrolyse enzymatique ?
- Quel est le bénéfice de l'hydrolyse des sous-unités de la R-PE en terme d'activité biologique ?

Bibliographie relative au projet

Autelitano D.J., Rajic A., Smith A.I., Berndt M.C., Ilag L.L., Vadas M. 2006. The cryptome: a subset of the proteome, comprising cryptic peptides with distinct bioactivities. *Drug Discov Today* 11, 306-14.

Cian, R.E., Martínez-Augustin, O., Drago, S.R., 2012. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. *Food Research International* 49, 364-372.

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). Thèse de doctorat de l'Université de Nantes, 153 p.

Denis, C., Morançais, M., Gaudin, P., Fleurence, J., 2009. Effect of enzymatic digestion on thallus degradation and extraction of hydrosoluble compounds from *Grateloupia turuturu*. *Botanica Marina* 52, 262-267.

Dumay, J., Clément, N., Morançais, M., Munier, M., Fleurence, J., 2011a. Des Molécules d'Intérêt issues des algues rouges: Exemple de la R-Phycoérythrine., Interreg III B BIOTECMAR final restitution, Plouzané, France.

Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P., Bergé, J.P., 2006. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry* 41, 2327-2332.

Dumay, J., Morançais, M., Fleurence, J., 2011b. Feasibility Study of the Recovery of R-Phycoerythrin from Red Algae in France. Interreg IIIB European Project BIOTECMAR, 16 p.

El Gamal, A.A., 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal* 18, 1-25.

Fitzgerald, C.n., Gallagher, E., Tasdemir, D., Hayes, M., 2011. Heart Health Peptides from Macroalgae and Their Potential Use in Functional Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 6829-6836.

Fleurence, J., 1999. The enzymatic degradation of algal cell walls: a useful approach for improving 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., Antoine, E., Luçon, M., 2002. Method for extracting and improving digestibility of *Palmaria palmata* proteins, Institut National de la Propriété Industrielle. Fr 2 811 866 -A1, France, 1-18.

Galland-Irmouli, A.V., Pons, L., Luçon, M., Villaume, C., Mrabet, N.T., Guéant, J.-L., Fleurence, J., 2000. One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 739, 117-123.

Glazer, A., 1994. Phycobiliproteins — a family of valuable, widely used fluorophores. *J. Appl. Phycol.* 6, 105-112.

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. *Anal. Biochem.* 358, 38-50.

Kim, S.-K., Wijesekara, I., 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*. 2, 1–9.

Pangestuti, R., Kim, S.-K., 2011. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods* 3, 255-266.

Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends Food Sc. Technol.* 19, 31-39.

Rode, F., Simier, J.-P., Piechaczyk, B., Deschamps, C., Guichoux-Clément, S., Davaine, A., Keromnes, E., 2012. Breizh'alg : 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. Conseil régional de Bretagne, 32 p.

Sekar, S., Chandramohan, M., 2008. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *J. Appl. Phycol.* 20, 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 Expr. Purif.* 64, 146-154.

Wang, T., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H.G., Hreggvidsson, G.O., Jónsson, J.Ó., Thorkelsson, G., Ólafsdóttir, G., 2010. Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*. *LWT - Food Science and Technology* 43, 1387-1393.

Yuan, Y.V., Carrington, M.F., Walsh, N.A., 2005. Extracts from dulse (*Palmaria palmata*) are effective antioxidants and inhibitors of cell proliferation in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 43, 1073-1081.

Yuan, Y.V., Walsh, N.A., 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology* 44, 1144-1150.